



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



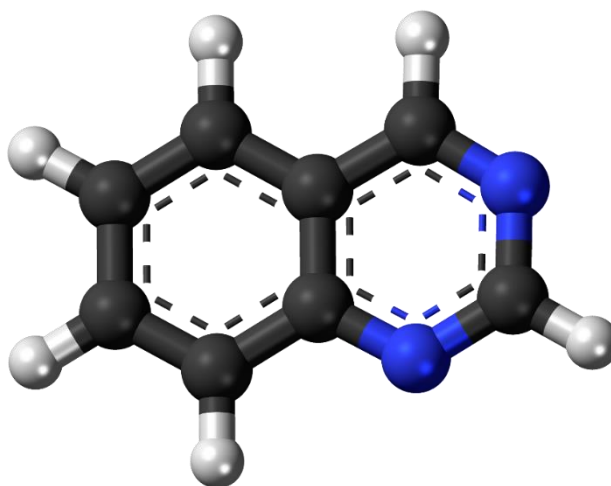
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟ-ΟΡΓΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*“Σύνθεση, ταυτοποίηση μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών και βιολογική αποτίμηση νέων παραγώγων κιναζολίνης ως εν δυνάμει αντικαρκινικών παραγόντων.”*

*“Synthesis, Spectroscopic Characterization and Biological Evaluation of quinazoline derivatives as potential anticancer agents.”*



**ΤΖΩΡΤΖΗ ΔΗΜΗΤΡΑ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2020**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Κοιωτής Δημήτριος:** Καθηγητής Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Μήτσος Χρήστος:** Εργαστηριακό Διδακτικό Προσωπικό (Ε.ΔΙ.Π) του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

**Μόσιαλος Δημήτριος:** Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κομιώτη Δημήτρη, καθηγητή Οργανικής Χημείας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την ανάθεση της διπλωματικής μου εργασίας και για την ευκαιρία που μου προσέφερε να ασχοληθώ με ένα ενδιαφέρον θέμα, αποκτώντας νέες και πολύτιμες γνώσεις.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στον επιβλέποντα της εργασίας μου κ. Χρήστο Μήτσο, μέλους ΕΔΙΠ του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση του τόσο κατά την διάρκεια των πειραμάτων, όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου Βιο-οργανικής Χημείας για το φιλικό κλίμα συνεργασίας και τη βοήθεια, που μου προσέφεραν όποτε τη χρειαζόμουν.

## Περιεχόμενα

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	6
<b>1. Εισαγωγή</b> .....	7
<b>1.1 Χημικές Ιδιότητες των Κιναζολινών</b> .....	7
<b>1.2 Πορείες σύνθεσης κιναζολινών – Ιστορική Αναδρομή</b> .....	9
<b>1.3 Βιολογικές Δράσεις Κιναζολινών</b> .....	9
<b>1.4 Αντικαρκινική Δράση Κιναζολινών</b> .....	12
<b>1.4.1 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης</b> .....	12
<b>1.4.2 Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)</b> .....	14
<b>1.4.3 Διαφορετικές στρατηγικές απενεργοποίησης της κινάσης τυροσίνης του EGFR</b> .....	16
<b>1.4.4 Στόχευση του EGFR με μικρού μοριακού βάρους μόρια που αναστέλλουν τη δραστηριότητα τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα</b> .....	18
<b>1.4.5 Κλινικά εγκεκριμένες από τον FDA κιναζολίνες ως αναστολείς του EGFR</b> ...	19
<b>1.5 Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα</b> .....	21
<b>2. ΣΚΟΠΟΣ</b> .....	23
<b>3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ</b> .....	24
<b>3.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας</b> .....	24
<b>3.2 Χρωματογραφία στήλης – Χρωματογραφία προσροφήσεως</b> .....	27
<b>3.3 Σημείο Τήξεως (Tm)</b> .....	28
<b>3.4 Εκχύλιση υγρού-υγρού</b> .....	30
<b>3.5 Περιστροφική εξάτμιση υπό κενό</b> .....	30
<b>3.6 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)</b> .....	31
<b>3.7 Συσκευή μικροκυμάτων</b> .....	32
<b>4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b> .....	34
<b>4.1 Επισκόπηση συνθετικής πορείας</b> .....	34
<b>4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης</b> .....	35
<b>5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ</b> .....	47
<b>6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	53
<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	54

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι κιναζολίνες αποτελούν αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις, οι οποίες καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δράσεων. Μια από τις σημαντικότερες φαρμακολογικές δράσεις τους, στην οποία βασίζεται και η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία είναι η αντικαρκινική. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι οι κιναζολίνες έχουν ιδιότητες αναστολής της κινάσης τυροσίνης, οι οποίες συνδέονται με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης όγκων.

Αξιοσημείωτη είναι η πρόοδος στη μελέτη και σύνθεση των 4-ανιλνοκιναζολινών για την καταπολέμηση του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα (ΜΜΚΠ). Τα συγκεκριμένα παράγωγα διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και ανταγωνίζονται το ATP στη θέση πρόσδεσης του στον υποδοχέα EGFR. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της φωσφορυλίωσης του EGFR και κατ' επέκταση και των μονοπατιών στα οποία εμπλέκεται. Στο 40-80% των περιπτώσεων ΜΜΚΠ, υπάρχει υπερέκφραση του EGFR, γι' αυτό και ο συγκεκριμένος υποδοχέας αποτελεί έναν πολύ σημαντικό στόχο για τη θεραπεία του.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η σύνθεση νέων υποκατεστημένων 4-ανιλνοκιναζολινών, τα οποία αποτελούν ανάλογα των ήδη υπαρχόντων αντικαρκινικών φαρμάκων-αναστολέων. Τη σύνθεση αυτών των παραγώγων ακολουθεί η ταυτοποίηση τους μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου και άνθρακα-13 και η βιολογική αποτίμηση τους. Πιο συγκεκριμένα, εξετάζονται αρχικά οι πιθανές κυτταροτοξικές ιδιότητες των ενώσεων και στη συνέχεια η επιλεκτικότητά τους σε καρκινικά κύτταρα.

## **ABSTRACT**

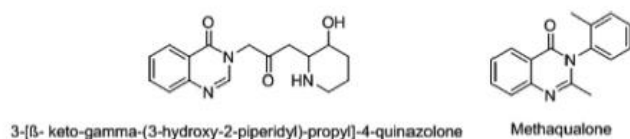
Quinazolines are aromatic heterocyclic compounds, which cover a wide range of pharmacological actions. One of their most important pharmacological actions, which is also the basis of this dissertation, is the anti-cancer property. More specifically, quinazolines have been shown to have tyrosine kinase inhibitory properties, which are associated with inhibition of tumor growth.

Significant progress has been made in the study and synthesis of 4-anilinoquinazolines for the treatment of non-small-cell lung carcinoma (NSCLC). These derivatives cross the cell membrane and compete with ATP at the EGFR receptor binding site. This results in the inhibition of phosphorylation of EGFR and consequently of the pathways in which it is involved. In 40-80% of NSCLC cases, there is overexpression of EGFR, which is why this receptor is a very important target for its treatment.

The aim of the present study is the synthesis of new substituted 4-anilinoquinazolines, which are analogs of existing anticancer drugs-inhibitors. The synthesis of these derivatives is followed by their identification through proton and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and their biological evaluation. More specifically, the possible cytotoxic properties of the compounds are first examined and then their selectivity in cancer cells.

## 1. Εισαγωγή

Η χημεία των παραγώγων κιναζολίνης έχει τραβήξει το ενδιαφέρον από τη δεκαετία του '50 με την αποσαφήνιση της δομής ενός φυσικού αλκαλοειδούς κιναζολίνης, από ένα ασιατικό φυτό γνωστό για τις ανθελονοσιακές του ιδιότητες (Εικόνα 1) [1]. Έτσι λοιπόν, ξεκίνησε μια προσπάθεια σύνθεσης ποικίλων υποκατεστημένων κιναζολινών, για την εύρεση περισσότερων ανθελονοσιακών παραγόντων. Ένα παράγωγο κιναζολίνης, εξαιρετικά υψηλής σημασίας ήταν και η μεθακαλόνη (methaqualone), όπως ονομάστηκε, η οποία έγινε γνωστή για τις υπνωτικές της ιδιότητες (Εικόνα 1) [1]. Εκτός από τα παραπάνω, τα παράγωγα κιναζολίνης μπορούν να δράσουν και ως υπνωτικά, ηρεμιστικά, αναλγητικά, αντιβηχικά, βρογχοδιασταλτικά, αντιυπερτασικά, αντισπασμωδικά, αντιφλεγμονώδη και άλλα τα οποία θα αναφερθούν στην πορεία (chemical properties of quinazolines) [2]. Έχει αποδειχθεί επίσης ότι οι κιναζολίνες έχουν ιδιότητες αναστολής της κινάσης τυροσίνης, οι οποίες συνδέονται με την παρεμπόδιση της ανάπτυξης όγκων) [2]. Σε αυτή την τελευταία ιδιότητα βασίζεται και η συγκεκριμένη διπλωματική εργασία.



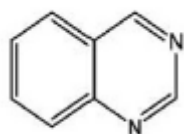
1. Φυσικό αλκαλοειδές κιναζολίνης με ανθελονοσιακές ιδιότητες και μεθακαλόνη [1].

### 1.1 Χημικές Ιδιότητες των Κιναζολινών

Οι κιναζολίνες είναι αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις οι οποίες αποτελούνται από δύο ενωμένους εξαμελείς αρωματικούς δακτυλίους, έναν δακτύλιο βενζολίου και έναν δακτύλιο πυριμιδίνης (Εικόνα 2) [3]. Επίσης, βρίσκονται συνήθως σε κρυσταλλική μορφή, έχουν κίτρινο χρώμα και διαλύονται στο νερό [4]. Τα περισσότερα από τα παράγωγα τους είναι σταθερά σε κρύο όξινο ή βασικό μέσο, αλλά σε υψηλή θερμοκρασία μπορεί να καταστραφούν και να υποβληθούν σε αντίδραση ανοίγματος δακτυλίου δίνοντας ο-αμινοβενζαλδεΐδη, αμμωνία και μυρμηκικό οξύ [4]. Από την άλλη, όταν βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου, μπορούν να οξειδωθούν εύκολα, οδηγώντας στην παραγωγή 3,4-διϋδρο-4-οξο κιναζολίνης, ενώ σε αλκαλικό μέσο με τη χρήση υπερμαγγανικού καλίου θα δώσουν 4,5-διϋδροπυριμιδο-4,5-

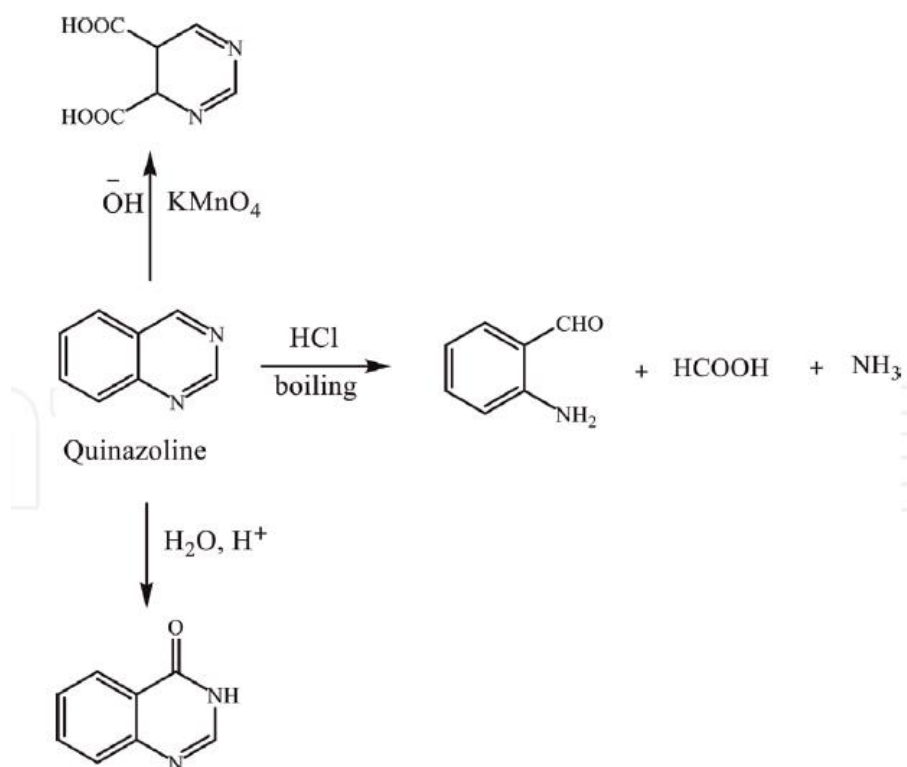
δικαρβοξυλικό οξύ (Εικόνα 3) [4]. Όσον αφορά τις ιδιότητές τους αυτές εξαρτώνται από τους ακόλουθους τρεις παράγοντες:

- Τη φύση των υποκαταστατών
- Την θέση των υποκαταστατών (εάν βρίσκονται στο δακτύλιο πυριμιδίνης ή το δακτύλιο βενζολίου)
- Την παρουσία συζυγίας στο δακτύλιο πυριμιδίνης



**Quinazoline**

2. Χημική Δομή Κιναζολίνης (5,6-βενζοπυριμιδίνης).

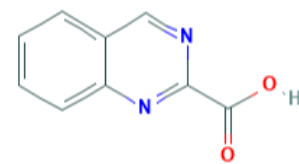


3. Αντιδράσεις οξείδωσης κιναζολίνης σε διαφορετικά μέσα.



## 1.2 Πορείες σύνθεσης κιναζολινών – Ιστορική Αναδρομή

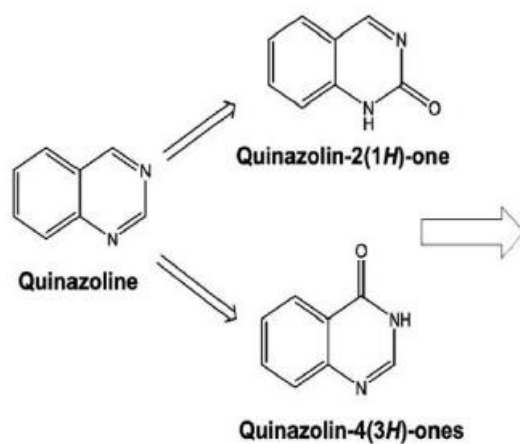
Το πρώτο παράγωγο κιναζολίνης συντέθηκε το 1869 από το χημικό Griess, μέσω της αντίδρασης κυανογόνων με ανθρανιλικό οξύ και ήταν η 2-κυανο-3,4-διυδρο-4-οξοκιναζολίνη [5]. Ο Griess ονόμασε τη συγκεκριμένη ένωση bicyanoamido benzoyl και το όνομα αυτό επικράτησε μέχρι το 1885 [5]. Λίγο αργότερα, το 1895 πραγματοποιήθηκε η πρώτη εργαστηριακή σύνθεση της κιναζολίνης από τους August Bischler and Lang μέσω μιας αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης του παραγώγου κιναζολινο-2-καρβοξυλικό οξύ (Εικόνα 4) [6]. Μια ακόμα πιο αποδοτική μέθοδο σύνθεσης της μητροικής ένωσης της κιναζολίνης (μη υποκατεστημένης) πραγματοποίησε και ο Siegmund Gabriel το 1903, μέσω αναγωγής της ο-νιτροβενζυλαμίνης με υδροϊώδιο και ερυθρό φώσφορο σε 2-αμινοβενζυλαμίνη. Το ανηγμένο ενδιάμεσο συμπυκνώθηκε με μυρμηγκικό οξύ και έδωσε διυδροκιναζολίνη, η οποία στη συνέχεια οξειδώθηκε σε κιναζολίνη [6].



4. 2-καρβοξυ-κιναζολίνη

## 1.3 Βιολογικές Δράσεις Κιναζολινών

Όπως προαναφέρθηκε, οι κιναζολίνες και τα παράγωγά τους καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δράσεων όπως αναλγητικές, αντιοξειδωτικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιπερτασικές, αντιφυματικές, αντιβακτηριακές, αντικές και αντικαρκινικές δράσεις [2]. Όλες οι φαρμακευτικές ιδιότητες των κιναζολινών, αλλά και των παραγώγων τους, των κιναζολινονών (κιναζολίνη με μια κετονομάδα) συνοψίζονται στην Εικόνα 6 [7]. Επίσης στις εικόνες που ακολουθούν αναπαριστώνται μερικά χαρακτηριστικά παραδείγματα παραγώγων κιναζολίνης για μερικές από τις παρακάτω φαρμακευτικές δράσεις [7].

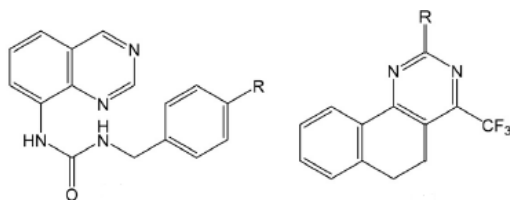


#### Medicinal properties of quinazolines

1. Analgesic activity
2. Anti-inflammatory activity
3. Anti-convulsant activity
4. Sedative-hypnotic activity
5. CNS activity
6. Anti-viral activity
7. Anti-cancer activity
8. Anti-tubercular activity
9. Anti-histaminic activity
10. Angiotensin receptor antagonistic activity
11. Anti-hypertensive activity
12. 5-HT receptor antagonistic activity
13. Anti-microbial activity
14. Miscellaneous activity

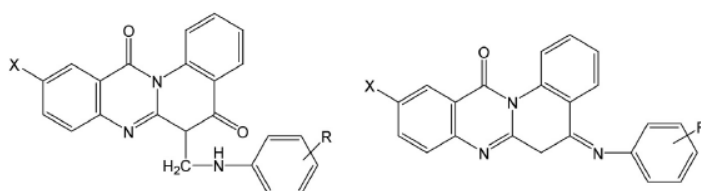
5. Φαρμακευτικές ιδιότητες κιναζολινών και κιναζολινονών.

#### 1) Αναλγητική δράση



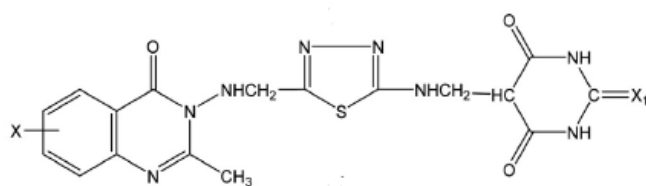
6. Παράγωγα Κιναζολίνης με αναλγητική δράση

#### 2) Αντιφλεγμονώδης Δράση



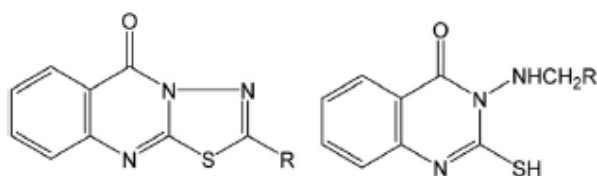
8. Παράγωγα Κιναζολίνης με αντιφλεγμονώδη δράση.

3) Αντισπασμωδική δράση



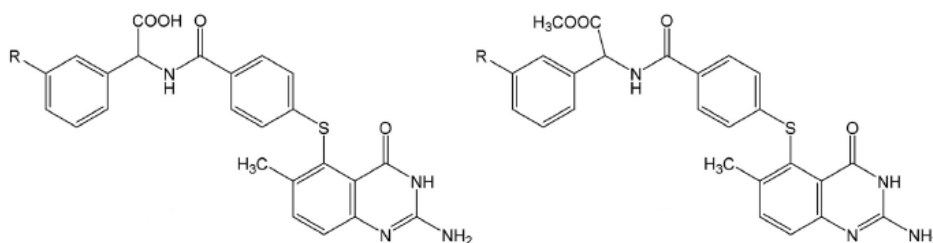
7. Παράγωγο κιναζολίνης με αντισπασμωδική δράση.

4) Αντική δραστηριότητα έναντι του HIV.



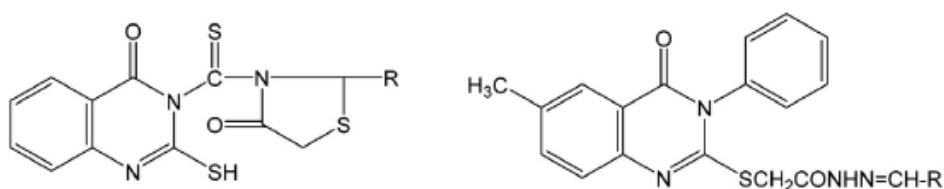
8. Παράγωγο κιναζολίνης με αντική δραστηριότητα έναντι του ιού HIV.

5) Αντικαρκινική δράση



9. Παράγωγα κιναζολίνης με αντικαρκινική δράση.

6) Αντιβακτηριακή Δράση



10. Παράγωγα κιναζολίνης με αντιβακτηριακή δράση

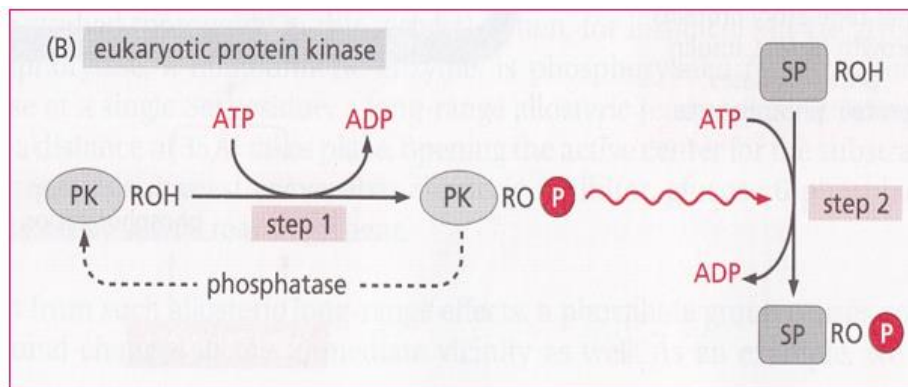
## 1.4 Αντικαρκινική Δράση Κιναζολινών

Από όλες τις παραπάνω δράσεις, η παρούσα διπλωματική εργασία θα εστιάσει στην αντικαρκινική ιδιότητα και πιο συγκεκριμένα στο ρόλο των κιναζολινών ως αναστολέων της κινάσης της τυροσίνης του υποδοχέα EGFR. Οι κινάσες αποτελούν τα πιο σημαντικά ένζυμα στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς είναι υπεύθυνες για τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής διαίρεσης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [1]. Οι παραπάνω κυτταρικές διεργασίες είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με τον καρκίνο, καθώς όπως είναι γνωστό, το πολυσταδιακό μοντέλο καρκινογένεσης περιλαμβάνει την ανάπτυξη των εξής φαινοτυπικών αλλοιώσεων: την απώλεια της ικανότητας του κυττάρου να φτάσει σε τελική διαφοροποίηση και την απώλεια της ρύθμισης του πολλαπλασιασμού ή της αναστολής πολλαπλασιασμού εξ'επαφής [8]. Εκτός από τις παραπάνω δράσεις, οι κινάσες εμπλέκονται και στην αγγειογένεση, η οποία όταν αναπτύσσεται στην περιοχή του πρωτοπαθούς όγκου, προάγει τη μεταστατική του ικανότητα, αυξάνοντας την πιθανότητα επέκτασης των καρκινικών κυττάρων μέσα στον αυλό των αγγείων [9]. Συνεπώς, η ανάπτυξη μη τοξικών και εκλεκτικών αναστολέων των πρωτεϊνικών κινάσων σε καρκινικά κύτταρα αποτελεί έναν πολύ σημαντικό στόχο για καρκινική θεραπεία. Παρακάτω θα αναλυθεί ο μηχανισμός αναστολής των κιναζολινών έναντι της κινάσης τυροσίνης του EGFR, γι' αυτό αρχικά θα χρειαστεί να επεξηγήσουμε τις έννοιες «Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης» και «EGFR».

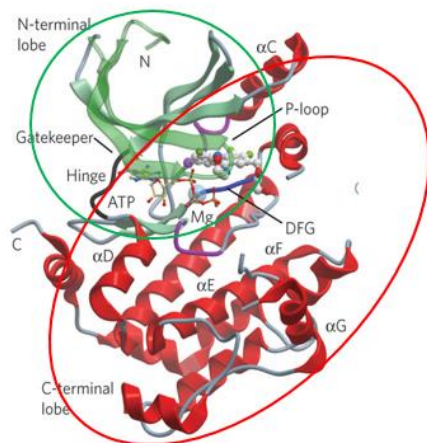
### 1.4.1 Πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης είναι ένζυμα, τα οποία τροποποιούν άλλες πρωτεΐνες μέσω της προσθήκης φωσφορικών ομάδων στα αμινοξικά κατάλοιπα τυροσίνης τους, με δότη φωσφορικών το ATP (φωσφορυλίωση) (Εικόνα 12) [13]. Η φωσφορυλίωση αποτελεί μια ομοιοπολική τροποποίηση η οποία μπορεί να αλλάξει τη διαμόρφωση μιας πρωτεΐνης με τέτοιο τρόπο, ώστε είτε να γίνει προσβάσιμη η καταλυτική περιοχή του ενζύμου, είτε να δημιουργηθεί μια θέση αναγνώρισης από ένα μόριο με συμπληρωματική περιοχή αλληλεπίδρασης [14]. Περιοχές αλληλεπίδρασης με φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης είναι οι SH2 και PTB [14]. Στις περισσότερες κινάσες στην καταλυτική τους περιοχή υπάρχει ένας βρόγχος ενεργοποίησης, ο οποίος στη διαμόρφωση 0 είναι κλειστός και εμποδίζει την επαφή

του ATP και της πρωτεΐνης υποστρώματος (Εικόνα 13). Για να παραμερίσει ο βρόγχος ενεργοποίησης και να επιτραπεί η πρόσβαση στο καταλυτικό κέντρο, πρέπει να φωσφορυλιωθεί σε ένα κατάλοιπο τυροσίνης (Εικόνα 13) [14]. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με αυτοφωσφορυλίωση, είτε με φωσφορυλίωση από μια άλλη πρωτεϊνική κινάση. Αυτή η ρυθμιστική φωσφορυλίωση λοιπόν ενεργοποιεί το ένζυμο με αλλοστερική αλλαγή διαμόρφωσης [14].



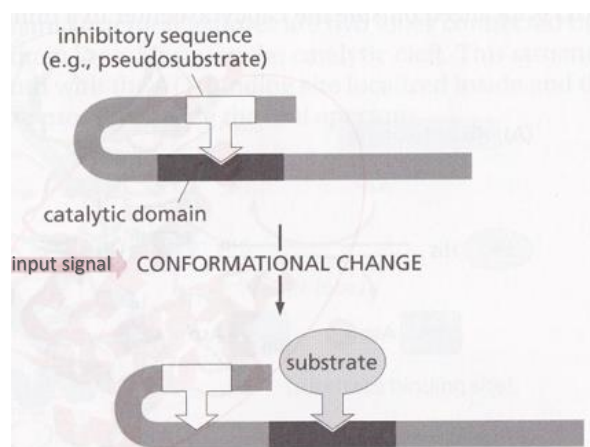
11. Μηχανισμός Δράσης ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών. Όπως βλέπουμε, πρώτο και βασικό βήμα είναι η αυτοφωσφορυλίωση της πρωτεϊνικής κινάσης (PK), ώστε να αλλάξει διαμόρφωση και να διευκολυνθεί η αλληλεπίδραση με το ATP και το πρωτεϊνικό υπόστρωμα (SP). Για να τερματιστεί η φωσφορυλίωση μια φωσφατάση είναι απαραίτητη για την αδρανοποίηση της φωσφορυλιωμένης κινάσης.



12. Δομή ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών. Τα κυρίαρχα δομικά χαρακτηριστικά των ευκαρυωτικών κινασών είναι οι δύο βρόχοι που συνδέονται με αλληλουχία εύκαμπτης άρθρωσης (hinge) και οι οποίοι δημιουργούν την καταλυτική σχισμή. Η δομή αυτή ανοίγει και κλείνει σαν ένα στόμα, με τη θέση δέσμευσης για το ATP να εντοπίζεται μέσα, ενώ τη θέση δέσμευσης για την πρωτεΐνη υπόστρωμα να εντοπίζεται έξω από το ανοίγμα στόματος.

Οι πρωτεϊνικές κινάσες τυροσίνης που έχουν δράση υποδοχέα, παρεμποδίζονται ενδογενώς από ανασταλτικά μοτίβα, τα οποία κρατούν κλειστό το βρόγχο ενεργοποίησης [13]. Η φωσφορυλίωση του βρόγχου ενεργοποίησης, η οποία συμβαίνει μόνο παρουσία σημάτων εισόδου, απελευθερώνει το ένζυμο από τους ενδομοριακούς περιορισμούς και ανοίγει την καταλυτική σχισμή μεταξύ του N- και C-λοβού. Συχνά τα ανασταλτικά μοτίβα που σταθεροποιούν την ανενεργή διαμόρφωση

της κινάσης είναι ψευδοϋποστρώματα, δηλαδή πολυπεπτιδικές αλληλουχίες που μοιάζουν με τη συναινετική ακολουθία φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης υποστρώματος και δεσμεύονται στο καταλυτικό κέντρο (Εικόνα 14) [14].



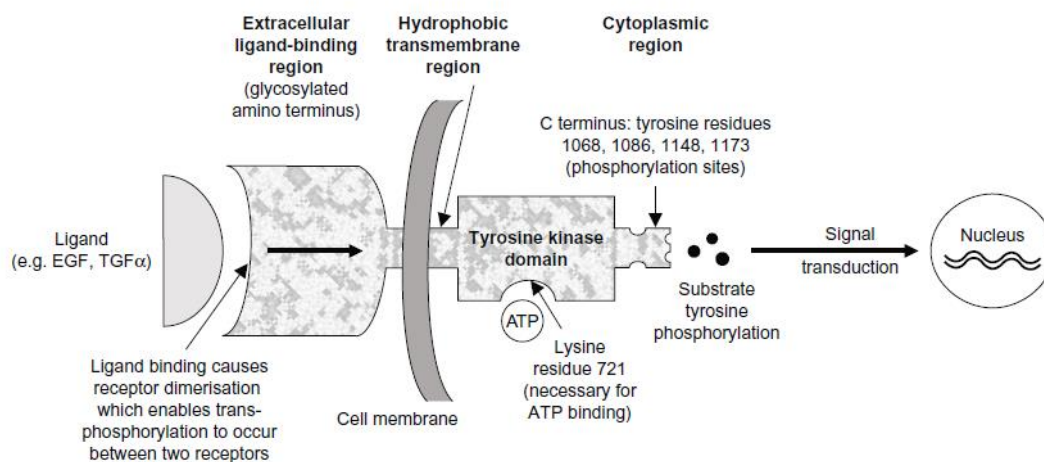
13. Η ενεργοποίηση των ευκαρυωτικών πρωτεϊνικών κινασών τυροσίνης.

#### 1.4.2 Υποδοχέας του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR)

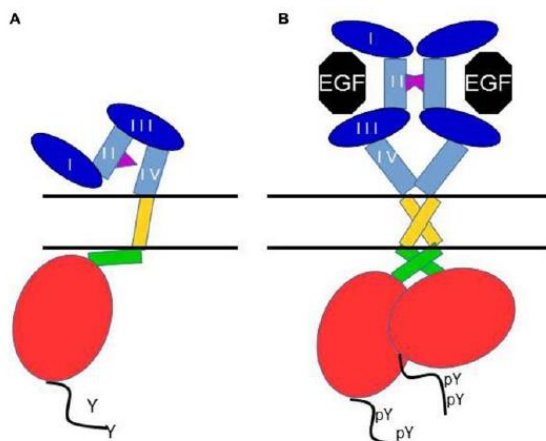
Ο EGFR ανήκει στην οικογένεια των ErbB υποδοχέων, η οποία περιλαμβάνει τέσσερις υποδοχείς κινάσης τυροσίνης [10]. Είναι μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία έχει ενδοκυτταρική δράση κινάσης τυροσίνης, εξαρτώμενη από την σύνδεση του προσδέτη [11]. Υπάρχει στους περισσότερους κυτταρικούς τύπους και αποτελείται από τρεις βασικές περιοχές (Εικόνα 15): α) μια N-τελική εξωκυτταρική περιοχή, β) μια υδρόφοβη διαμεμβρανική περιοχή και γ) μια C-τελική ενδοκυτταρική περιοχή, η οποία περιλαμβάνει την κινάση τυροσίνης και μια ρυθμιστική καρβοξυτελική περιοχή (COOH-τελικό άκρο) [11]. Η εξωκυτταρική περιοχή αποτελεί θέση πρόσδεσης για διάφορους πολυπεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες, οι οποίοι μετά την πρόσδεση τους προκαλούν μια σειρά βιολογικών αποκρίσεων, μερικές από τις οποίες είναι οι εξής: μιτογένεση ή απόπτωση, ενισχυμένη κυτταρική κινητικότητα, πρωτεϊνική έκκριση και διαφοροποίηση ή αποδιαφοροποίηση [1]. Έχει βρεθεί επίσης ότι ο EGFR εμπλέκεται στη μορφογένεση, στη διατήρηση των κυττάρων και στην επιδιόρθωση βλαβών [11].

Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 15, δυο από τους αυξητικούς παράγοντες που προσδέονται εξωκυτταρικά και ενεργοποιούν τον EGFR είναι ο EGF και ο TGF $\alpha$  [11]. Στον άνθρωπο έχουν περιγραφεί τουλάχιστον επτά διαφορετικοί προσδέτες του EGFR και ο κάθε ένας από αυτούς περιλαμβάνει την πεπτιδική αλληλουχία του EGF, που

είναι υπεύθυνη για τη δέσμευση στον υποδοχέα και την ενεργοποίησή του. Η δέσμευση τους στον υποδοχέα προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση του και τελικά οδηγεί στον ομοδιμερισμό ή ετεροδιμερισμό του με άλλα μέλη-υποδοχείς της οικογένειας ErbB (Εικόνα 16) [12]. Το διμερισμό του υποδοχέα διαδέχεται η ενεργοποίηση της ενδοκυτταρικής κινάσης τυροσίνης και η δέσμευση ενός μορίου ATP στο κατάλοιπο λυσίνης 721 της καρβοξυτελικής περιοχής [12]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα και την trans-φωσφορυλίωση του άλλου μονομερούς του [11]. Η αυτοφωσφορυλίωση πραγματοποιείται με την προσθήκη φωσφορικών ομάδων σε κατάλοιπα τυροσίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο, τα οποία αποτελούν μετά την περιοχή-στόχο για τις πρωτεΐνες που περιέχουν τις περιοχές αναγνώρισης SH2 (Εικόνα 15) [10]. Το συμβάν αυτό λοιπόν πυροδοτεί την έναρξη πολλών μεταγωγικών μονοπατιών, ειδικά των MAPK, Akt και JNK μονοπατιών, τα οποία οδηγούν στη σύνθεση του DNA και στην κυτταρική ανάπτυξη [1].



14. Σχηματική αναπαράσταση της δομής και της λειτουργίας του EGFR.



15. Σχηματική αναπαράσταση των διαμορφωτικών αλλαγών κατά την ενεργοποίηση του EGFR.

Η ενεργοποίηση του EGFR διεγείρει τη μεταγωγή ενδοκυττάρων σημάτων, τα οποία ελέγχουν λειτουργίες όπως ο κυτταρικός θάνατος, ο πολλαπλασιασμός και η διαφοροποίηση, ενώ η απορρύθμιση του έχει συνδεθεί με μια ποικιλία όγκων, οι οποίοι οδηγούν σε διήθηση και μετάσταση [11]. Πιο συγκεκριμένα, η μη κανονική ενεργοποίηση του EGFR οδηγεί σε ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη, πολλαπλασιασμό, αναστολή της απόπτωσης, απευαισθητοποίηση σε σήματα αναστολής της ανάπτυξης, αγγειογένεση, διήθηση ιστών και μετάσταση [15]. Ένας από τους πιο μελετημένους επιθηλιακούς όγκους, που συνδέεται με την απορρύθμιση του EGFR είναι και ο μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) [1]. Στο 40-80% των περιπτώσεων ΜΜΚΠ, υπάρχει υπερέκφραση του EGFR, γι' αυτό και ο συγκεκριμένος υποδοχέας αποτελεί έναν πολύ σημαντικό στόχο για τη θεραπεία του [1]. Οι θεραπευτικές προσεγγίσεις αφορούν τόσο την ανάπτυξη μορίων για την απενεργοποίηση του υποδοχέα, όσο και την ανίχνευση και ταυτοποίηση των ενεργοποιητικών του μεταλλάξεων (που είναι συχνές στον ΜΜΚΠ) [1].

#### **1.4.3 Διαφορετικές στρατηγικές απενεργοποίησης της κινάσης τυροσίνης του EGFR**

Η στοχευμένη αντι-EGFR θεραπεία περιλαμβάνει τους εξής τρόπους απενεργοποίησης [1]:

1. Μονοκλωνικά αντισώματα, τα οποία όταν προσδένονται στην εξωκυτταρική περιοχή του EGFR, ανταγωνίζονται τους ενδογενείς προσδέτες (Εικόνα 17).
2. Μικρά μόρια τα οποία δεσμεύονται στη θέση πρόσδεσης ATP της κινάσης τυροσίνης και την απενεργοποιούν (Εικόνα 17).
3. Ανασυνδυασμένες τοξίνες οι οποίες έχουν μελετηθεί σε πειραματικά πρωτόκολλα και αποτελούν και αυτές μια ελπιδοφόρο στρατηγική για τη θεραπεία όγκων που υπερεκφράζουν τον υποδοχέα. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η τοξίνη TP-38, η οποία αποτελείται από μια γενετικά τροποποιημένη μορφή της εξωτοξίνης της Ψευδομονάδας (*Pseudomonas*) και από το μόριο-προσδέτη TGF- $\alpha$ , μέσω του οποίου προσδένεται στον EGFR.
4. Αντινοσηματικά ολιγονουκλεοτίδια ή RNAi, τα οποία μειώνουν την έκφραση του EGFR.



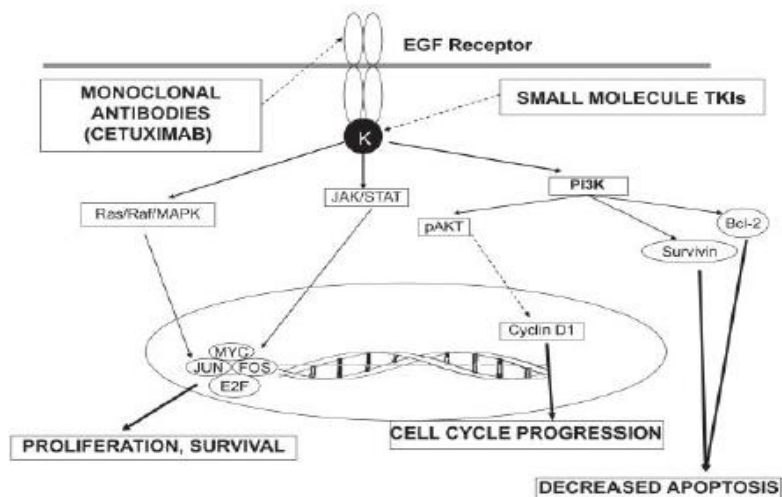
5. Ανασταλτικές πρωτεΐνες-προσαρμογείς, που στοχεύουν και μπλοκάρουν το μεταγωγικό μονοπάτι που επάγει ο EGFR.

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι τρόποι στη χημειοθεραπεία έναντι των καρκινικών κυττάρων που υπερεκφράζουν την ErbB οικογένεια υποδοχέων, είναι τα μονοκλωνικά αντισώματα και τα μικρά μόρια-αναστολείς [15]. Τα τελευταία είναι αναστολείς της δραστηριότητας της κινάσης τυροσίνης των υποδοχέων και έχουν την ικανότητα να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να στοχεύουν το ενδοκυτταρικό τμήμα του EGFR [15]. Μπορούν επίσης να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις ομάδες, ανάλογα με την κατάσταση (ενεργή ή ανενεργή) της κινάσης που αναγνωρίζουν και την αναστρεψιμότητα πρόσδεσης τους:

1. Αναστολείς τύπου I: Αυτού του είδους οι αναστολείς αποτελούν την πλειοψηφία των ανταγωνιστικών αναστολέων και αναγνωρίζουν την ενεργή διαμόρφωση της κινάσης [16]. Δεσμεύονται στη θέση σύνδεσης ATP, μέσω δεσμών υδρογόνου και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων μέσα, αλλά και γύρω από την περιοχή δέσμευσης [16].

2. Αναστολείς τύπου II: Εν αντιθέσει, οι αναστολείς της κινάσης τυροσίνης τύπου II δρουν στην ανενεργή (μη φωσφορυλιωμένη) κατάσταση του ενζύμου και τη σταθεροποιούν. Όπως και οι αναστολείς τύπου I, θεωρούνται ανταγωνιστικοί αναστολείς και στοχεύουν τη θέση δέσμευσης ATP του ενζύμου [15].

3. Αναστολείς τύπου III: Είναι μη ανταγωνιστικοί-αναστολείς του ATP και δεσμεύονται σε μια αλλοστερική θέση της πρωτεΐνης και όχι στη θέση σύνδεσης του ATP. Επίσης, προσδένονται στο ένζυμο ανεξάρτητα από την κατάσταση ενεργοποίησης του. Οι αναστολείς αυτής της κατηγορίας παρουσιάζουν το μεγαλύτερο βαθμό επιλεκτικότητας της κινάσης-στόχου, επειδή εκμεταλλεύονται θέσεις πρόσδεσης και ρυθμιστικούς μηχανισμούς οι οποίοι είναι μοναδικοί για κάθε κινάση [16].

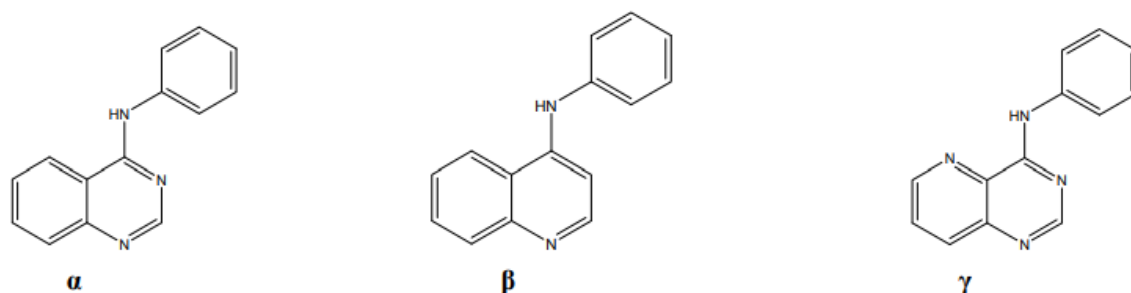


16. Οι δυο τάξεις φαρμάκων της αντι-EGFR θεραπείας και οι περιοχές της δράσης τους.

#### 1.4.4 Στόχευση του EGFR με μικρού μοριακού βάρους μόρια που αναστέλλουν τη δραστικότητα τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα

Η μελέτη μικρού μοριακού βάρους μορίων με ανασταλτική δράση έναντι της κινάσης τυροσίνης ξεκίνησε το 1980 με την αναγνώριση φυσικών παραγώγων όπως η γενιστεΐνη (genistein), η κερκετίνη (quercetin), η ερμπστατίνη (erbstatin), η λαβεντουστίνη (lavendustin) και η χερβιμυκίνη Α (herbimycin) [17]. Αποδείχθηκε ότι τα συγκεκριμένα φυσικά παράγωγα είναι εξαιρετικά τοξικά και δεν παρουσιάζουν κάποια εξειδίκευση. Παρ' όλα αυτά αποτέλεσαν εκμαγείο για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη λιγότερο τοξικών και περισσότερο ισχυρών και επιλεκτικών αναστολέων της κινάσης τυροσίνης [17]. Οι πρώτες προσπάθειες ανάπτυξης μιας νέας γενιάς μορίων τα οποία ανταγωνίζονται το ATP στη θέση πρόσδεσής του στον EGFR ξεκίνησαν στα μέσα του 1990 [17]. Οι επικρατούσες δομές των συγκεκριμένων ανασταλτικών μορίων είναι οι εξής: οι ανιλνοκιναζολίνες (anilinoquinazolines), οι ανιλνοκινολίνες (anilinoquinolines) και οι ανιλνοπυριδοπυριμιδίνες (anilinoptyridopyrimidines) (Εικόνα 18).

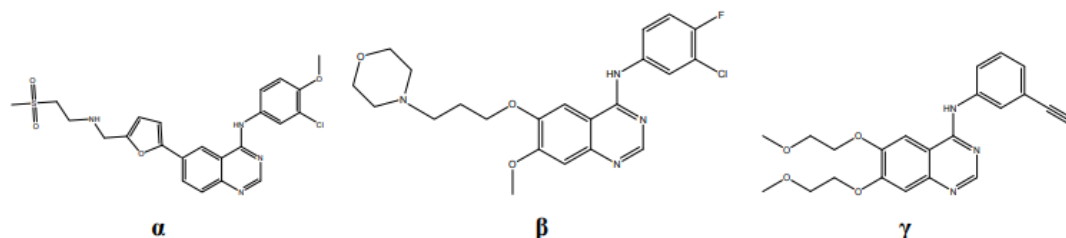
Με την πάροδο των χρόνων έχουν μελετηθεί χιλιάδες μόρια-αναστολείς των κινασών τυροσίνης των υποδοχέων ErbB και κάποια από αυτά έχουν αναγνωρισθεί ως



17. α) Δομή 4-ανιλνοκιναζολινών, β) Δομή 4-ανιλνοκινολινών γ) Δομή 4-ανιλνοπυριδοπυριμιδινών.

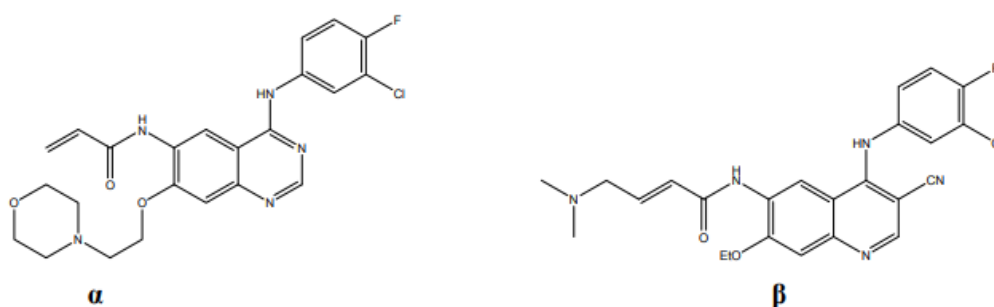
θεραπευτικά φάρμακα για συγκεκριμένους τύπους καρκίνου, ενώ πολλά άλλα βρίσκονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα μορίων που έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση αποτελούν το Lapatinib, το Gefitinib και το Erlotinib (Εικόνα 19), τα οποία ανήκουν στην τάξη των ανιλνοκιναζολινών και δρουν ως αντιστρεπτοί αναστολείς της δραστικότητας της τυροσινικής κινάσης του διμερούς EGFR/ErbB-2 [18]. Πιο συγκεκριμένα, το Gefitinib και το Erlotinib παρουσιάζουν επιλεκτική ανασταλτική δράση έναντι του EGFR, ενώ το Lapatinib δρα τόσο έναντι του EGFR, όσο και του ErbB-2 υποδοχέα. Κλινικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για το Gefitinib και το Erlotinib απέδειξαν ότι τα συγκεκριμένα φάρμακα παρουσιάζονται αποτελεσματικά μόνο σε ασθενείς με μη μικροκυτταρικό καρκίνο των πνευμόνων, ενώ υψηλότερη απόκριση έχει παρατηρηθεί σε ασθενείς που εκφράζουν

συγκεκριμένες μεταλλάξεις του EGFR [18]. Αυτό το γεγονός οφείλεται πιθανότατα σε δομικές αλλαγές της κινάσης τυροσίνης του υποδοχέα που ευνοούν την πρόσδεση του αναστολέα [19]. Δυστυχώς, σε μερικές περιπτώσεις ασθενών που αρχικά αποκρίνονταν ικανοποιητικά στη θεραπεία με τα δύο αυτά φάρμακα, αναπτυσσόταν στην πορεία αντίσταση σε αυτά λόγω μιας δευτέρας μετάλλαξης στον EGFR [19].



18. Χημικές δομές αντιστρεπτών αναστολέων της δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης του EGFR που έχουν εγκριθεί για κλινική χρήση. α) Lapatinib, β) Gefitinib, γ) Erlotinib

Αργότερα, μελετήθηκαν μερικοί μη αντιστρεπτοί αναστολείς της δραστηριότητας της τυροσινικής κινάσης του EGFR όπως το Canertinib και το EKB-569 (Εικόνα 20) και αποδείχθηκε ότι τα συγκεκριμένα μόρια παρακάμπτουν την αντίσταση στη θεραπεία και αξίζει να ερευνηθούν περαιτέρω [19].

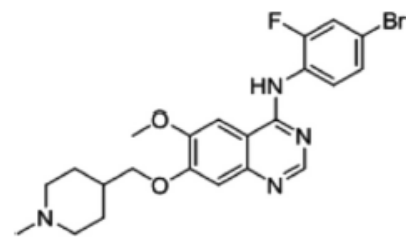


19. Μη αντιστρεπτοί αναστολείς της δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης του EGFR: α) Canertinib, β) EKB-569.

#### 1.4.5 Κλινικά εγκεκριμένες από τον FDA κιναζολίνες ως αναστολείς του EGFR

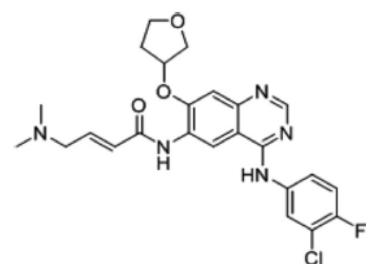
Στη συγκεκριμένη ενότητα θα αναλυθούν μερικά επιπλέον παράγωγα κιναζολινών τα οποία είναι κλινικά εγκεκριμένα από τον FDA ως αντικαρκινικά φάρμακα και δρουν ανασταλτικά έναντι του EGFR.

1. Βαντετανίμπη (Vandetanib): Το φάρμακο ονομάζεται «Caprelsa», εγκρίθηκε από τον FDA τον Απρίλιο του 2011 και χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του μεταστατικού, μυελοειδούς καρκινώματος του θυρεοειδούς [20]. Η βαντετανίμπη (Εικόνα 21) αποτελεί ισχυρό αναστολέα του υποδοχέα VEGFR-2, του EGFR και των κινασών τυροσίνης RET, ενώ αναστέλλει ασθενώς τον VEGFR-3 [20]. Επίσης, εξετάστηκε σε κλινικές μελέτες η πιθανή θεραπευτική της δράση έναντι του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα και αποδείχθηκε τελικά ότι ήταν ακατάλληλη για τη θεραπεία του συγκεκριμένου τύπου καρκίνου [20].



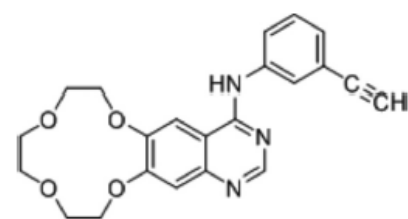
20. Χημική δομή βαντετανίμπης.

2. Αφατινίμπη (Afatinib): Η ονομασία του φαρμάκου είναι «Gilotrif» και εγκρίθηκε από τον FDA τον Ιούλιο του 2013 [1]. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα, ο οποίος θα αναλυθεί με περισσότερες λεπτομέρειες στην επόμενη ενότητα. Δρά ως ένας μη αντιστρεπτός αναστολέας, με τη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών στη θέση πρόσδεσης στους υποδοχείς EGFR και ErbB-2 (HER2) [21]. Τέλος, μελετάται και η δράση της έναντι του καρκίνου του μαστού, όπου υπάρχει υπερέκφραση του HER2, και τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών στη φάση II δείχνουν αρκετά ελπιδοφόρα [21].



21. Χημική δομή Αφατινίμπης.

3. Ικοτινίμπη (Icotinib): Η ικοτινίμπη με το εμπορικό όνομα «Conmana», εγκρίθηκε στην Κίνα από τον SFDA τον Ιούλιο του 2011 για τη θεραπεία του μη μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα [1]. Προς το παρόν, λοιπόν, το φάρμακο διατίθεται μόνο στην αγορά της Κίνας και παράγεται από τη φαρμακευτική εταιρεία «Beta Pharma» η οποία τη συνέθεσε πρώτη φορά το 2002 [22]. Η ικοτινίμπη αποτελεί έναν εξαιρετικά επιλεκτικό αναστολέα της κινάσης τυροσίνης του EGFR και προσδένεται αντιστρεπτά στη θέση σύνδεσης του ATP, παρεμποδίζοντας τη μεταγωγή σήματος του υποδοχέα [1].



22. Χημική δομή Ικοτινίμπης.

## 1.5 Μη μικροκυτταρικός καρκίνος του πνεύμονα

Ο καρκίνος του πνεύμονα αποτελεί την κυρίαρχη αιτία θανάτου που σχετίζεται με καρκίνο, στις ανεπτυγμένες χώρες [23]. Ο εκτιμώμενος αριθμός θανάτων λόγω του καρκίνου του πνεύμονα είναι 1.38 εκατομμύρια το χρόνο [24]. Μόνο το 6 με 14% των αντρών ασθενών με αυτόν τον κακοήγη όγκο επιβιώνουν για 5 ή παραπάνω χρόνια μετά τη διάγνωση, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τις γυναίκες είναι 7 με 18% [23]. Ο καρκίνος του πνεύμονα κατηγοριοποιείται σε δυο τύπους καρκίνου με βάση τη βιολογία, τη θεραπεία και την πρόγνωση του: το μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (ΜΜΚΠ) που αφορά το 85% των περιπτώσεων και το μικροκυτταρικό καρκίνο που αφορά το 15% [23]. Οι διαφορές αυτών των δυο καρκίνων θα αναφερθούν συνοπτικά στην επόμενη παράγραφο.

Ο ΜΜΚΠ εμφανίζεται σε καπνιστές, αλλά και σε μη καπνιστές (με μεγαλύτερη συχνότητα στους πρώτους) και ταξινομείται σε τρεις υποκατηγορίες καρκίνων οι οποίοι προέρχονται από πνευμονικό ιστό: το αδenoκαρκίνωμα (περίπου το 40% των περιπτώσεων), το καρκίνωμα εκ μεγάλων κυττάρων (περίπου το 15% των περιπτώσεων) και το πλακώδες καρκίνωμα (περίπου το 30% των περιπτώσεων) [25]. Εν αντιθέσει, ο μικροκυτταρικός καρκίνος ξεκινά στην πλειονότητα των περιπτώσεων από τους βρόγχους, τους αεραγωγούς και το κέντρο του στήθους και εμφανίζεται σπάνια σε ανθρώπους που δεν καπνίζουν [25]. Επίσης, μεθίσταται σε άλλα όργανα πολύ γρηγορότερα από το μη μικροκυτταρικό καρκίνο και μικροσκοπικά αποτελείται από πολύ μικρότερα κύτταρα [25]. Ακόμα ένα σημαντικό χαρακτηριστικό του είναι ότι μπορεί να αποβεί θανάσιμος μέσα σε λίγες εβδομάδες αν δε θεραπευτεί, κάτι που δεν ισχύει για το μη μικροκυτταρικό καρκίνο [24]. Τέλος, και οι δύο τύποι καρκίνου του πνεύμονα διαγιγνώσκονται με τα ίδια τεστ, ενώ έχουν και το ίδιο ρίσκο όσον αφορά την ανάπτυξη τους που δεν είναι άλλος από το κάπνισμα [24].

Ο ΜΜΚΠ είναι ένας από τους λίγους καρκίνους που ως κύρια αιτία του μπορεί να αναγνωριστεί ένας μόνο παράγοντας και συγκεκριμένα το κάπνισμα [23]. Επίσης, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι περίπου το 90% όλων των καρκίνων του πνεύμονα οφείλεται στο ενεργητικό κάπνισμα τσιγάρου [25]. Στον κίνδυνο των καπνιστών να αναπτύξουν το συγκεκριμένο καρκίνο προστίθεται και ο κίνδυνος στον οποίο εκτίθενται οι μη καπνιστές μέσω του παθητικού καπνίσματος [25].

Τα πιο γνωστά ανάμεσα στα είκοσι καρκινογόνα που υπάρχουν στον καπνό του τσιγάρου και συμβάλουν σημαντικά στην ανάπτυξη του ΜΜΠΚ είναι οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες και οι νιτροζαμίνες [26]. Αυτές οι δυο χημικές ενώσεις ενεργοποιούνται από το κυτόχρωμα P450 και τις γλουταθειονυλο-S-τρανσφεράσες και σχηματίζουν σύμπλοκα με το DNA, τα οποία προκαλούν γενετικές μεταλλάξεις [26]. Επιπλέον παράγοντες που πιθανότατα συνδέονται με το συγκεκριμένο τύπο καρκίνου είναι: η ατμοσφαιρική ρύπανση, οι επίκτητες ασθένειες των πνευμόνων συμπεριλαμβανομένων εκείνων που αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα επαγγελματικής έκθεσης στη σκόνη (π.χ. για τους μεταλλωρύχους), διατροφικές συνήθειες, ιογενείς παράγοντες καθώς και η γενετική προδιάθεση, αλλά οι αποδείξεις είναι πολύ λιγότερες σε σύγκριση με τους προαναφερθέντες παράγοντες κινδύνου [26].

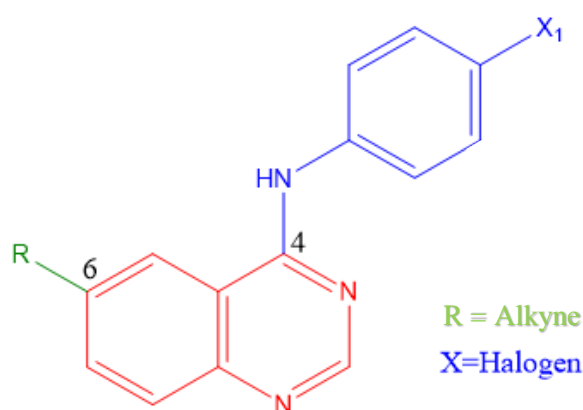
Εκτεταμένη έρευνα στη μοριακή και κυτταρική βιολογία του ΜΜΚΠ έχει αποκαλύψει ότι πολλαπλά σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη διαφοροποίηση και στην απόπτωση είναι απορρυθμισμένα [26]. Επίσης, έχει μελετηθεί μια σειρά γενετικών και επιγενετικών αλλαγών που συνδέονται με το συγκεκριμένο καρκίνωμα όπως σημειακές μεταλλάξεις, ενίσχυση γονιδίων, υπερέκφραση, προσθήκες, μεταθέσεις, υπερμεθυλίωση υποκινητών γονιδίων και ελλείψεις πολλών και διαφορετικών χρωμοσωμικών τόπων [25]. Οι αλλαγές αυτές οδηγούν στην απενεργοποίηση ογκοκατασταλτικών γονιδίων και στην ενεργοποίηση πρωτο-ογκογονιδίων [26].

Όπως προαναφέρθηκε, ο EGFR υπερεκφράζεται στο 40-80% των περιπτώσεων ΜΜΚΠ και αποτελεί έναν πολλά υποσχόμενο στόχο για τη θεραπεία του. Δυστυχώς, η στοχευμένη θεραπεία του από συγκεκριμένους αναστολείς της τυροσινικής κινάσης του EGFR δεν έχει αποφέρει ακόμα τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό πιθανότατα οφείλεται σε ανεπαρκή αναστολή της δραστηριότητας της κινάσης τυροσίνης, στη δημιουργία νέων μονοπατιών επιβίωσης των καρκινικών κυττάρων, καθώς και σε καινούριες μεταλλάξεις που μπορεί να αποκτήθηκαν κατά τη διάρκεια της θεραπείας [26].

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Όπως είδαμε εκτεταμένα στην εισαγωγή, ο υποδοχέας EGFR αποτελεί ένα ελπιδοφόρο μόριο-στόχο στην ανάπτυξη στοχευμένης θεραπείας έναντι καρκινικών όγκων. Η στόχευση της ενδοκυτταρικής περιοχής του υποδοχέα επιτυγχάνεται με κιναζολινικά παράγωγα τα οποία δεσμευόμενα αντιστρεπτά ή μη στον υποδοχέα, αναστέλλουν τη φωσφορυλίωσή του. Μία από τις επικρατούσες δομές των συγκεκριμένων ανασταλτικών μορίων, που έχουν μελετηθεί και εγκριθεί για κλινική χρήση (Lapatinib, Gefitinib, Erlotinib) είναι οι 4-ανιλινοκιναζολίνες (anilinoquinazolines).

Σκοπός λοιπόν της παρούσας μελέτης είναι η σύνθεση και η βιολογική αποτίμηση νέων κιναζολινικών παραγώγων τα οποία, θα περιέχουν μια αλογονο-υποκατεστημένη ανιλίνη στη θέση 4 (όπως οι 4-ανιλινοκιναζολίνες), αλλά και διάφορα αλκίνια ως υποκαταστάτες στη θέση 6 (Εικόνα 24). Θα αποτελούν λοιπόν, ανάλογα των ήδη υπάρχοντων αντικαρκινικών φαρμάκων-αναστολέων της δραστηριότητας τυροσινικής κινάσης του EGFR. Τη σύνθεση αυτών των παραγώγων θα ακολουθήσει η ταυτοποίηση τους μέσω της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου και άνθρακα και η βιολογική αποτίμηση τους. Μέσω της βιολογικής αποτίμησης θα εξεταστεί η ανασταλτική δράση των ενώσεων έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Τελικός σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εξέταση της πιθανής αντικαρκινικής δράσης τους και κατ' επέκταση της πιθανής χρήσης τους ως αντικαρκινικούς παράγοντες.



23. Χημική δομή παραγώγων κιναζολίνης.

### 3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Στη συγκεκριμένη ενότητα, θα αναλυθούν οι αρχές των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Σκοπός των συγκεκριμένων μεθόδων ήταν ο καθαρισμός, η ταυτοποίηση και ο χαρακτηρισμός των εκάστοτε νεοσυντιθέμενων ενώσεων.

#### 3.1 Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ δύο φάσεων, μιας ακίνητης (*stationary phase*) και μιας κινητής (*mobile phase*). Η κινητή φάση μετακινεί τα συστατικά του μίγματος επί της ακίνητης με διαφορετική ταχύτητα. Μια ουσία, η οποία συγκρατείται ισχυρότερα από την ακίνητη φάση, μετακινείται με μικρότερη ταχύτητα από κάποια άλλη, η οποία συγκρατείται λιγότερο ισχυρά. Επειδή τα μόρια του μίγματος κατανέμονται συγχρόνως και στις δύο φάσεις αποκαθίσταται μια δυναμική ισορροπία για κάθε κατηγορία μορίων.

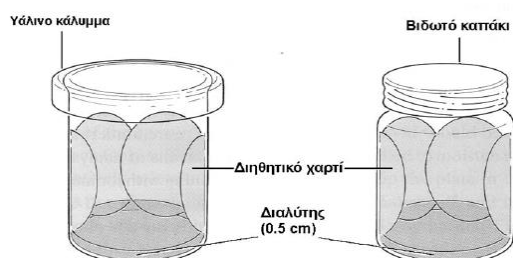
Η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας είναι γρήγορη και απλή μέθοδος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί: α) ως τεχνική καθοδήγησης για τον έλεγχο της καθαρότητας μιας ενώσεως ή της πολυπλοκότητας ενός μίγματος, β) για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των εφαρμοζόμενων μεθόδων διαχωρισμού και καθαρισμού μιας ενώσεως, γ) για τον καθορισμό των ιδανικών συνθηκών για τον καλύτερο διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος σε μεγάλη κλίμακα (π.χ. με υγρή χρωματογραφία στήλης), και δ) για την ποιοτική μελέτη της πορείας μιας χημικής αντίδρασης και τον καθορισμό των βέλτιστων συνθηκών πραγματοποίησής αυτής.

Κατά την τεχνική της χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC) η ακίνητη φάση επιστρώνεται με κατάλληλο τρόπο επάνω σε γυαλί ή φύλλο πλαστικού ή αλουμινίου (φορέας επίστρωσης). Ως υλικά επίστρωσης είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν διοξείδιο του πυριτίου (Silica gel), τριοξείδιο του αργιλίου (Alumina), κυτταρίνη σε μορφή σκόνης ή ακόμα και ρητίνες με όξινες ή βασικές ομάδες. Ως κινητή φάση (διαλύτης ανάπτυξης) χρησιμοποιούνται διάφοροι διαλύτες (διχλωρομεθάνιο, εξάνιο, τολουόλιο, οξικός αιθυλεστέρας, πετρελαϊκός αιθέρας, ακετόνη, μεθανόλη κ.ά.) ή και μίγματα διαλυτών.

Η συσκευή η οποία χρησιμοποιείται στη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας αποτελείται από υάλινο δοχείο με κάλυμμα (δοχείο ανάπτυξης). Μέσα στο δοχείο

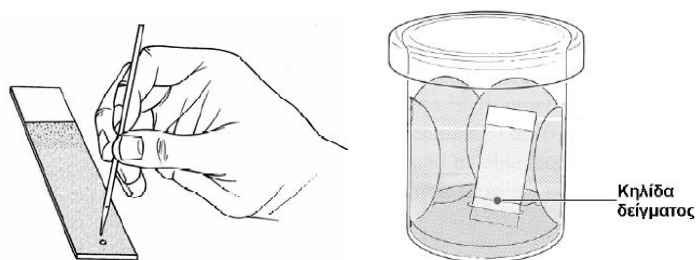


τοποθετείται ο διαλύτης (στοιβάδα διαλύτη 0.5 cm) και το δοχείο κλείνεται ώστε να επιτευχθεί κορεσμός του χώρου από τους ατμούς του διαλύτη. Για να γίνει γρήγορα ο κορεσμός, τοποθετείται στο πλαϊνό τοίχωμα του δοχείου διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με διαλύτη ανάπτυξης, το άκρο του οποίου είναι εμβαπτισμένο στο διαλύτη (Εικόνα 25).



#### 24. Συσκευή χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας.

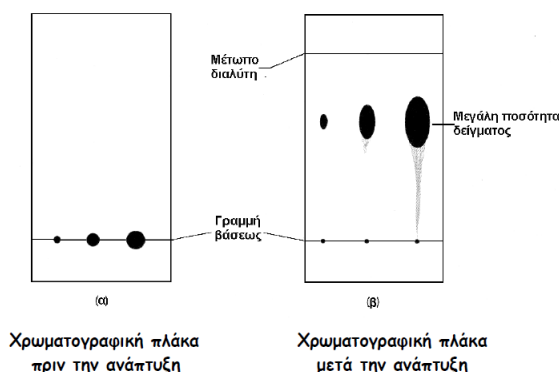
Η τοποθέτηση του δείγματος στο πλακίδιο γίνεται με τριχοειδές σωληνάκι, υπό μορφή κηλίδας, 1 cm περίπου από τη βάση του πλακιδίου. Επάνω στο ίδιο πλακίδιο μπορούν να τοποθετηθούν περισσότερες από μία κηλίδες (διαφορετικών δειγμάτων) στο ίδιο ύψος από τη βάση του πλακιδίου και σε ίσες αποστάσεις μεταξύ τους (1-1.5 cm). Μετά την ξήρανση της κηλίδας το πλακίδιο τοποθετείται στο δοχείο ανάπτυξης (Εικόνα 26).



#### 25. Τοποθέτηση του δείγματος στο πλακίδιο και μεταφορά πλακιδίου στο δοχείο ανάπτυξης.

Ο διαλύτης ανάπτυξης ανεβαίνει στο πλακίδιο αργά-αργά λόγω τριχοειδών φαινομένων συμπαρασύροντας και τα συστατικά του δείγματος σε διαφορετικές αποστάσεις (ανάπτυξη χρωματογραφήματος). Όταν το μέτωπο ανάπτυξης του διαλύτη πλησιάζει το επάνω άκρο του πλακιδίου τότε αυτό απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης και σημειώνεται το μέτωπο του διαλύτη με μολύβι. Μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, το πλακίδιο ξηραίνεται (με ρεύμα αέρα ή στο φούρνο) και ακολουθεί ο προσδιορισμός των θέσεων των κηλίδων. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται

εμφάνιση του χρωματογραφήματος. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι κηλίδες πρέπει να είναι όσο το δυνατόν μικρές και να προέρχονται από αραιά διαλύματα των δειγμάτων (~1-1.5%), έτσι ώστε μετά την εμφάνιση του χρωματογραφήματος να μην παρατηρούνται ουρές κάτω από τις κηλίδες ή υπερκάλυψη αυτών.



26. Χρωματογραφική πλάκα πριν και μετά την ανάπτυξη.

Για την ανίχνευση των κηλίδων των δειγμάτων χρησιμοποιούνται:

1. Φυσικές μέθοδοι, όπως η υπεριώδη ακτινοβολία (χρησιμοποιούνται ειδικές πλάκες φθορίζουσες στο υπεριώδες φως οπότε στις θέσεις όπου υπάρχει ουσία η οποία απορροφά εμφανίζονται σκούρες κηλίδες)
2. Χημικές μέθοδοι, όπως ο ψεκασμός με ειδικά αντιδραστήρια, όταν οι ουσίες οι οποίες χρωματογραφούνται μπορούν να δώσουν έγχρωμα παράγωγα με τα αντιδραστήρια αυτά και η έκθεση σε χώρο ο οποίος περιέχει ατμούς ενός αερίου αντιδραστηρίου, π.χ.  $\text{NH}_3$ ,  $\text{I}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ .

Ο βαθμός συγκράτησης μιας ουσίας στην επίπεδη χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας εκφράζεται με τον παράγοντα επιβράδυνσης  $R_f$ , ο οποίος ορίζεται ως ο λόγος της αποστάσεως που κινήθηκε η ουσία προς την απόσταση που κινήθηκε ο διαλύτης. Η απόσταση που κινήθηκε ο διαλύτης μετριέται από τη θέση του μετώπου, ενώ η απόσταση του δείγματος μετριέται από το κέντρο της κηλίδας ή από το σημείο που αντιστοιχεί στη μέγιστη πυκνότητά της. Η τιμή του  $R_f$  επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως π.χ. από τη σύσταση του διαλύτη αναπτύξεως, από τη φύση του υλικού επίστρωσης, κ.ά. Σε καθορισμένες όμως συνθήκες αποτελεί χαρακτηριστική σταθερά και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας, συγκρίνοντας την τιμή του  $R_f$  αυτής με τις τιμές των  $R_f$  γνωστών ουσιών στις ίδιες συνθήκες.

### 3.2 Χρωματογραφία στήλης – Χρωματογραφία προσροφήσεως

Η παλαιότερη και πιο συνηθισμένη χρωματογραφική μέθοδος υγρής χρωματογραφίας, είναι η χρωματογραφία στήλης. Στην κλασική υγρή χρωματογραφία η χρησιμοποιούμενη στήλη είναι υάλινος σωλήνας, ο οποίος φέρει πορώδες διάφραγμα στην μια του άκρη (Εικόνα 28). Ως εναλλακτική λύση χρησιμοποιείται προχοΐδα και αντί για πορώδες διάφραγμα τοποθετείται υαλοβάμβακας ο οποίος συγκρατεί στοιβάδα άμμου 3 mm.



27. Χρωματογραφική Στήλη.

Για την προετοιμάσια της στήλης, είναι αρχικά απαραίτητη η ανάμιξη της στατικής φάσης (συνήθως Silica Gel) με το διαλύτη έκλουσης (η υγρή κινητή φάση). Το μίγμα αυτό προστίθεται στη στήλη είτε απευθείας είτε σταδιακά, ενώ η στήλη δονείται (με ελαφρά κτυπήματα) για να γίνει το γέμισμα ομοιόμορφο. Ακολούθως, ανοίγεται η στρόφιγγα της στήλης για να απομακρυνθεί ο διαλύτης που βρίσκεται πάνω από την επιφάνεια του στερεού υλικού. Ποτέ δεν αφήνεται η επιφάνεια του υγρού να κατέβει κάτω από την επιφάνεια του στερεού (διαφορετικά η στήλη ξηραίνεται).

Μετά την πλήρωση, η στήλη εκπλένεται με τον διαλύτη έκλουσης (η διαδικασία λέγεται εξισορρόπηση της στήλης). Μετά την εξισορρόπηση η στήλη είναι έτοιμη να δεχθεί το προς διαχωρισμό δείγμα. Για να γίνει η προσθήκη του δείγματος, πρέπει η επιφάνεια του υγρού έκλουσης να ταυτιστεί με την επιφάνεια του στερεού.

Στη συνέχεια προστίθεται το δείγμα διαλυμένο στον ελάχιστο δυνατό όγκο διαλύτη έκλουσης, με τη βοήθεια σιφωνίου (ή πιπέτας Pasteur). Όταν το δείγμα απορροφηθεί, προστίθεται στη στήλη με τον ίδιο τρόπο μικρή ποσότητα διαλύτη (περίπου ίσου όγκου με τον όγκο του δείγματος) για να προωθηθεί το δείγμα μέσα στη στήλη. Μετά την τοποθέτηση του δείγματος η στήλη εκλούεται με τον διαλύτη

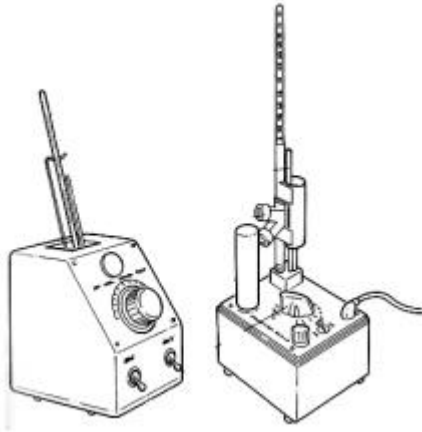
έκλουσης για τη χρωματογράφιση του δείγματος και τέλος, ακολουθεί η συλλογή των κατάλληλων κλασμάτων. Στην περίπτωση όπου οι ουσίες είναι άχρωμες συλλέγονται κλάσματα συγκεκριμένου όγκου. Μετά τη συλλογή των κλασμάτων γίνεται ανάλυση αυτών για να προσδιοριστεί σε ποια από αυτά υπάρχει ουσία. Ένας απλός και γρήγορος τρόπος ελέγχου της καθαρότητας των κλασμάτων αποτελεί η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.

### 3.3 Σημείο Τήξεως ( $T_m$ )

Σημείο τήξεως μίας οργανικής ουσίας θεωρείται η θερμοκρασία, στην οποία η στερεά ουσία και το τήγμα της, βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας. Σ' αυτή τη θερμοκρασία η στερεά ουσία και το τήγμα έχουν την ίδια τάση ατμών. Αρκετές οργανικές ενώσεις έχουν στην στερεή κατάσταση κρυσταλλική μορφή, δηλαδή τα μόριά τους είναι τοποθετημένα στο κρυσταλλικό πλέγμα με μεγάλη τάξη. Το σημείο τήξεως είναι η θερμοκρασία κατά την οποία η τάξη αυτή εξαφανίζεται λόγω θερμικής ταλάντωσης των μορίων. Το σημείο τήξεως μίας ουσίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης καθαρότητάς της, όπως επίσης και για την ταυτοποίησή της. Αποτελεί μία φυσικοχημική ιδιότητα, η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε στερεή ένωση.

Μία οργανική ένωση θεωρείται καθαρή όταν έχει ένα σαφές σημείο τήξεως, δηλαδή μία μικρή περιοχή σημείου τήξεως. Πιο συγκεκριμένα, όταν η περιοχή στην οποία εμφανίζεται η πρώτη σταγόνα τήγματος μέχρι την πλήρη μετατροπή της ουσίας σε υγρό είναι μικρότερη των  $2^{\circ}\text{C}$ , τότε η ένωση θεωρείται καθαρή. Μη καθαρές ουσίες τήκονται σε μία σχετικά μεγάλη περιοχή θερμοκρασίας.

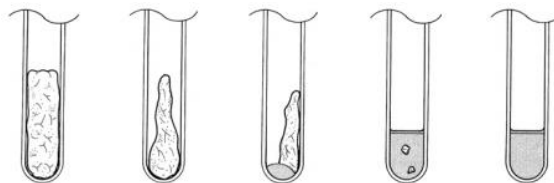
Μέτρηση του σημείου τήξεως γίνεται με ειδικά όργανα, τα οποία συνήθως αποτελούνται από ένα ελαιόλουτρο ή θερμομαντική πλάκα όπου θερμαίνεται η ουσία, της οποίας μικρή ποσότητα είναι τοποθετημένη σε τριχοειδή σωλήνα, και ένα θερμόμετρο για τη μέτρηση της θερμοκρασίας.



28. Συσκευή μέτρησης σημείου τήξεως.

Πριν τη μέτρηση είναι αναγκαίο να τοποθετηθεί η ουσία σε τριχοειδή σωλήνα. Συνήθως οι εμπορικά διαθέσιμοι τριχοειδείς σωλήνες για τη μέτρηση του σημείου τήξεως είναι ανοιχτοί και στα δύο άκρα και όπως είναι φυσικό πρέπει το ένα άκρο να κλείσει πριν τοποθετηθεί η ουσία. Αυτό πραγματοποιείται με την επαφή του σωλήνα με φλόγα. Πριν τοποθετηθεί η προς μέτρηση ουσία στον τριχοειδή πρέπει να είναι ξηρή και με τη μορφή σκόνης. Πιέζουμε το ανοιχτό άκρο του τριχοειδή στην ουσία, μέχρις ότου να καλυφθεί πλήρως το στόμιό του. Στη συνέχεια αφήνουμε τον τριχοειδή να πέσει μαλακά και από μικρό ύψος, έτσι ώστε η ουσία να κατέβει στο κλειστό άκρο. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρις ότου η ουσία να πακτωθεί καλά και να καταλαμβάνει ύψος περίπου 3mm στον τριχοειδή. Ακολούθως ο τριχοειδής τοποθετείται στο όργανο και αρχίζει η θέρμανσή του.

Η πρώτη σταγόνα του υγρού υποδηλώνει την αρχή της τήξης. Η ολοκλήρωση της τήξης λαμβάνει χώρα στο σημείο όπου εξαφανίζεται και ο τελευταίος κρύσταλλος. Η περιοχή θερμοκρασίας στην οποία λαμβάνουν χώρα, η εμφάνιση της πρώτης σταγόνας υγρού και η τήξη του τελευταίου κρυστάλλου, είναι το σημείο τήξεως της ουσίας.



29. Η πορεία της ουσίας στον τριχοειδή σωλήνα κατά τη μέτρηση του σημείου τήξεως.

### 3.4 Εκχύλιση υγρού-υγρού

Η εκχύλιση στηρίζεται στη διαφορά διαλυτότητας μιας ουσίας σε δοσμένη θερμοκρασία και πίεση στους διαφόρους διαλύτες. Με την εκχύλιση συνήθως παραλαμβάνουμε μια ουσία από ένα υδατικό της διάλυμα σε κάποιο οργανικό διαλύτη στον οποίο η συγκεκριμένη ένωση παρουσιάζει μεγαλύτερη διαλυτότητα στη θερμοκρασία περιβάλλοντος σε σχέση με τη διαλυτότητά της στο νερό. Η εκχύλιση είναι εργαστηριακή τεχνική κατάλληλη για την απομόνωση ουσιών από διαλύματα ή στερεά μίγματα, για διαχωρισμό ουσιών όπως και για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων προσμίξεων (έκπλυση).

Στην εκχύλιση προκειμένου να χρησιμοποιηθεί ορισμένη ποσότητα διαλύτη, είναι προτιμότερο αυτός να μοιραστεί σε μέρη και να γίνουν πολλαπλές εκχυλίσεις αντί για μία. Ένας καλός διαλύτης για εκχύλιση πρέπει να έχει μικρή διαλυτότητα στην άλλη φάση και χαμηλό σημείο ζέσεως για να απομακρύνεται εύκολα. Στην περίπτωση που η εκχύλιση γίνεται για να απομακρύνουμε προσμίξεις (έκπλυση) ο διαλύτης πρέπει να διαλύει τις προσμίξεις και όχι την ουσία. Συνηθέστεροι διαλύτες είναι οι διαιθυλαιθέρας, διίσοπροπυλαιθέρας, πετρελαϊκός αιθέρας, πεντάνιο, εξάνιο, βενζόλιο, χλωροφόρμιο και ο τετραχλωράνθρακας.

Η εκχύλιση πραγματοποιείται μέσα σε διαχωριστική χοάνη όπου τα δύο υγρά ανακατεύονται με ισχυρή ανάδευση, αφήνονται για λίγο σε ηρεμία και διαχωρίζονται. Μετά την ανατάραξη ανοίγουμε προσεκτικά τη στρόφιγγα, για να ελαττωθεί η πίεση που αναπτύσσεται μέσα στη χοάνη. Μετά την εκτέλεση του αριθμού των εκχυλίσεων που κρίνεται αναγκαίος κάθε φορά, συγκεντρώνονται τα εκχυλίσματα της στιβάδας που περιέχει την ουσία σε στεγνή κωνική φιάλη και ξηραίνονται. Ακολουθεί απλή διήθηση σε στεγνή σφαιρική φιάλη για απομάκρυνση του ξηραντικού και τέλος απομακρύνεται ο διαλύτης με απλή απόσταξη ή με περιστροφική εξάτμιση υπό κενό.

### 3.5 Περιστροφική εξάτμιση υπό κενό

Ο περιστροφικός εξεταμιστήρας είναι μία συσκευή, η οποία έχει σχεδιασθεί για τη γρήγορη απομάκρυνση μεγάλης ποσότητας πτητικών διαλυτών από διαλύματα σε μειωμένη πίεση (Εικόνα 31). Η περιστροφική εξάτμιση βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην απομάκρυνση διαλυτών κατά την συμπύκνωση κλασμάτων που προέρχονται από εκχύλιση ή χρωματογραφία στήλης με σκοπό την απομόνωση και τον καθαρισμό

ουσιών. Αυτό που κάνει την περιστροφική εξάτμιση να ξεχωρίζει από τις άλλες μεθόδους απόσταξης υπό μειωμένη πίεση, είναι το γεγονός ότι η αποστακτική φιάλη περιστρέφεται κατά τη διάρκεια της απόσταξης. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου οφείλονται στην περιστροφή της φιάλης, όπου από τη μία πλευρά το διάλυμα θερμαίνεται σε μεγάλη επιφάνεια καθιστώντας την απόσταξη γρήγορη και από την άλλη αποφεύγονται οι εκτινάξεις κατά την συμπύκνωση διαλυμάτων στερεών ουσιών, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα τον περιορισμό του κινδύνου ατυχήματος.



30. Βασικός τύπος συσκευής περιστροφικού εξατμιστήρα.

### 3.6 Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR)

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού αποτελεί το ισχυρότερο εργαλείο για την ταυτοποίηση οργανικών δομών. Για τη λήψη ενός φάσματος NMR είναι αρκετό ένα πολύ μικρό δείγμα, το οποίο παραμένει αναλλοίωτο. Η φασματοσκοπία NMR παρέχει ένα μεγάλο όγκο πληροφοριών σχετικά με τη δομή της ένωσης και δίνει επίσης τη δυνατότητα προσδιορισμού πολλών δομών. Ωστόσο, για τον προσδιορισμό των δομών πολύπλοκων οργανικών ενώσεων, η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με άλλα είδη φασματοσκοπίας και χημικής ανάλυσης.

Η φασματοσκοπία NMR χρησιμοποιείται για τη μελέτη μίας μεγάλης ποικιλίας πυρήνων, όπως  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$  και  $^{31}\text{P}$ . Οι πυρήνες πρωτονίου και άνθρακα θεωρούνται από τους οργανικούς χημικούς, οι χρησιμότεροι, αφού το υδρογόνο και ο άνθρακας αποτελούν τα κύρια συστατικά των οργανικών ενώσεων. Να τονιστεί σε αυτό το σημείο ότι τα φασματόμετρα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίων είναι τα πιο διαδεδομένα.

Ένας πυρήνας με περιττό ατομικό αριθμό ή περιττό μαζικό αριθμό διαθέτει πυρηνικό σπιν, το οποίο μπορεί να παρατηρηθεί από ένα φασματοόμετρο NMR. Το πρωτόνιο είναι ο απλούστερος πυρήνας και επειδή ο ατομικός του αριθμός ισούται με 1, διαθέτει σπιν. Ο όρος αυτός θα μπορούσε να περιγραφεί σαν η περιστροφή του πρωτονίου γύρω από τον εαυτό του, ως μια περιστρεφόμενη σφαίρα με θετικό φορτίο. Η κίνηση αυτή παράγει ένα μαγνητικό πεδίο που ονομάζεται μαγνητική ροπή. Όταν ένας πυρήνας υφίσταται το σωστό συνδυασμό μαγνητικού πεδίου και ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας για τη μεταβολή του σπιν του, λέμε ότι βρίσκεται σε «συντονισμό» και η απορρόφηση ενέργειας που εμφανίζει καταγράφεται από το φασματοφωτόμετρο NMR.

### 3.7 Συσκευή μικροκυμάτων

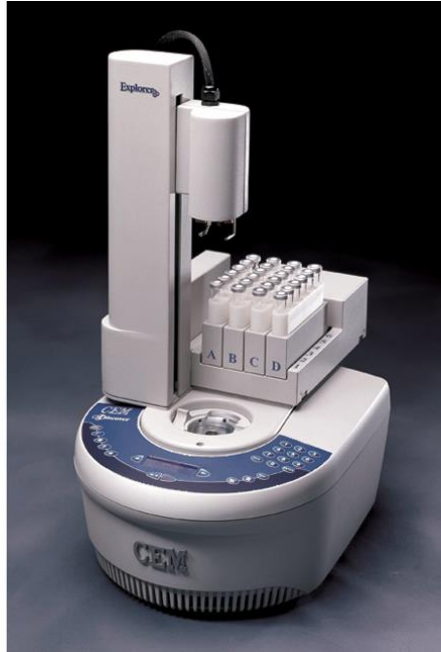
Τα μικροκύματα είναι μια μορφή ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας και ως εκ τούτου αποτελούνται από μια ηλεκτρική συνιστώσα και μια μαγνητική συνιστώσα κάθετες μεταξύ τους. Το ηλεκτρικό πεδίο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ενέργειας μεταξύ της πηγής μικροκυμάτων και του αντικειμένου που δέχεται την ακτινοβολία. Η θέρμανση με μικροκύματα, η οποία είναι μια μορφή διηλεκτρικής θέρμανσης, εξηγείται σαν παραγωγή θερμότητας σε υλικά με χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα από την ενέργεια ενός ηλεκτρικού πεδίου υψηλής συχνότητας. Μια ουσία, για να μπορεί να απορροφήσει τη θερμότητα από τα μικροκύματα, πρέπει να έχει ασύμμετρη μοριακή δομή, όπως για παράδειγμα το μόριο του νερού.

Η θέρμανση με μικροκύματα χρησιμοποιείται ευρύτατα και με μεγάλη επιτυχία γιατί δίνει υψηλές αποδόσεις υπό ηπιότερες και φιλικότερες προς το περιβάλλον συνθήκες. Το κύριο πλεονέκτημα της χρήσης μικροκυμάτων στις οργανικές συνθέσεις είναι οι μικρότεροι χρόνοι αντίδρασης. Για κάθε αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10°, ο ρυθμός της αντίδρασης σχεδόν διπλασιάζεται.

Με την τεχνολογία μικροκυμάτων είναι δυνατό να εκτελούνται γρηγορότερα, ασφαλέστερα και πιο ελεγχόμενα οι διαλύσεις με την ευκολία του αυτοματισμού. Στην παρούσα πειραματική μελέτη, Όλες οι αντιδράσεις που απαιτούσαν τη χρήση μικροκυμάτων πραγματοποιήθηκαν στη συσκευή μικροκυμάτων CEM Discover με προσάρτηση Explorer που λειτουργεί: 1) σε συχνότητα 2,45 GHz με συνεχή δύναμη



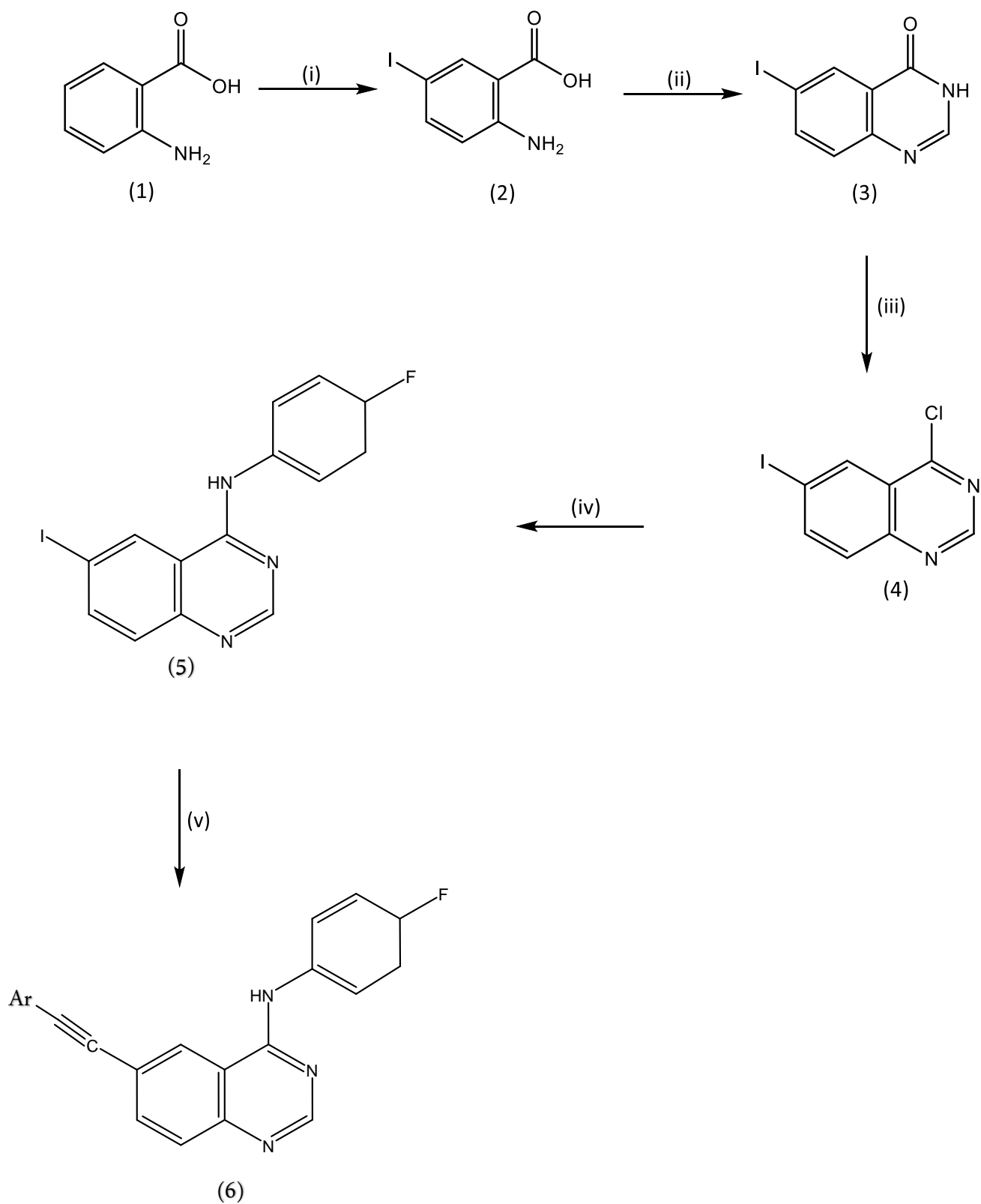
ακτινοβολίας από 0 έως 300 Watt, 2) με μέγιστη εκπεμπόμενη ισχύ της τάξης των 300 Watt και 3) μέγιστη επιτρεπτή πίεση της τάξης των 250 PSI (Εικόνα 32).



31. Συσκευή μικροκυμάτων CEM Discover.

## 4. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

### 4.1 Επισκόπηση συνθετικής πορείας



(i): KI (ιωδιούχο κάλιο), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (υπεροξειδίο του υδρογόνου), CH<sub>3</sub>COOH (οξικό οξύ)

(ii): HCONH<sub>2</sub> (φορμαμίδιο)

(iii): SOCl<sub>2</sub> (θειονυλο χλωρίδιο), DMF (N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο)

(iv): αλογονο-υποκατεστημένη ανιλίνη, i-PrOH (ισοπροπανόλη)

(v): Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (τετράκις-τριφαινυλο φωσφίνο παλλάδιο), CuI (ιωδιούχος χαλκός),

Et<sub>3</sub>N (τριαιθυλαμίνη), DMF (N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο), αρυλο-αλκίνιο

## 4.2 Μεθοδολογία σύνθεσης

Στο πρώτο μέρος των αντιδράσεων (αντιδράσεις i-iv) πραγματοποιήθηκε η σύνθεση της *N*-(3-χλωροφαινυλο)-6-ιωδοκιναζολίν-4-αμίνης (**5**) η οποία αποτέλεσε την πρώτη ύλη για τις τελικές αντιδράσεις.

Στην αντίδραση (i) χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη το 2-αμινοβενζοϊκό οξύ (**1**), στο οποίο με χρήση ιωδιούχου καλίου (KI), υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και οξικού οξέος (CH<sub>3</sub>COOH) έγινε υποκατάσταση με ιώδιο στη θέση 5 ώστε να προκύψει το 2-αμινο-5-ιωδο-βενζοϊκό οξύ (**2**).

Η αντίδραση (ii) είναι ουσιαστικά η κυκλοποίηση του προϊόντος (**2**) ώστε να προκύψει η 6-ιωδο κιναζολιν-4(3H)-όνη (**3**) χρησιμοποιώντας φορμαμίδιο (HCONH<sub>2</sub>). Η αντίδραση αυτή ονομάζεται σύνθεση Niementowski

Στην αντίδραση (iii) πραγματοποιείται χλωρίωση του προϊόντος (**3**) προς την 6-ιωδο-4-χλωροκιναζολίνη (**4**), χρησιμοποιώντας θειονυλοχλωρίδιο (SOCl<sub>2</sub>). Ως καταλύτης χρησιμοποιήθηκε το N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF) και θερμάνθηκε με reflux.

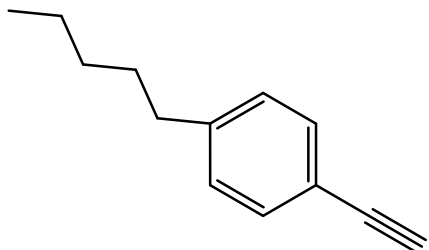
Η αντίδραση (iv) είναι η πυρηνόφιλη αντικατάσταση του χλωρίου της ένωσης (**4**) με μια 3-χλώρο ανιλίνη και 4-φθόρο ανιλίνη αντίστοιχα, με ισοπροπανόλη (i-PrOH) ως διαλύτη ώστε να προκύψει η *N*-(4-φθοροφαινυλο)-6-ιωδοκιναζολίν-4-αμίνη (**5**).

Στο δεύτερο μέρος πραγματοποιήθηκαν πέντε αντιδράσεις Sonogashira χρησιμοποιώντας ως πρώτη ύλη το προϊόν (**5**) καθώς και πέντε διαφορετικά αλκίνια ώστε να προκύψουν τα τελικά προϊόντα (**6a**), (**6b**), (**6c**), (**6d**) και (**6e**). Η αντίδραση Sonogashira είναι μια διασταυρούμενη σύζευξη ενός αλογονιδίου με ένα αλκίνιο, η οποία πραγματοποιείται παρουσία τριαιθυλαμίνης (Et<sub>3</sub>N) και χρησιμοποιεί ως καταλύτη το τετράκις-τριφαινυλο φωσφορικό παλλάδιο (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>) και συγκαταλύτη

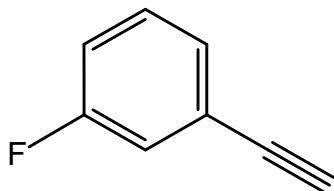
τον ιωδιούχο χαλκό (CuI), σε άνυδρο διαλύτη N,N-διμεθυλοφορμαμίδιο (DMF). Η όλη διαδικασία της αντίδρασης Sonogashira απαιτεί ξηρές συνθήκες.

**Τα αλκίνια που χρησιμοποιήθηκαν ως υποκαταστάτες είναι τα εξής:**

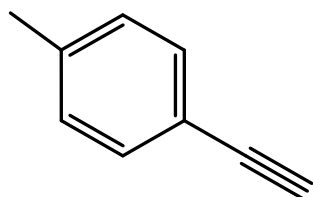
a) 1-ethynyl-4-pentylbenzene



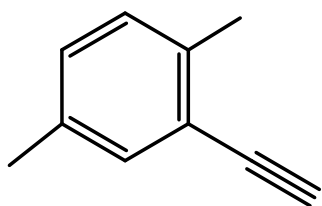
b) 1-ethynyl-3-fluorobenzene



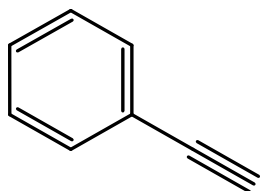
c) 1-ethynyl-4-methylbenzene



d) 2-ethynyl-1,4-dimethylbenzene

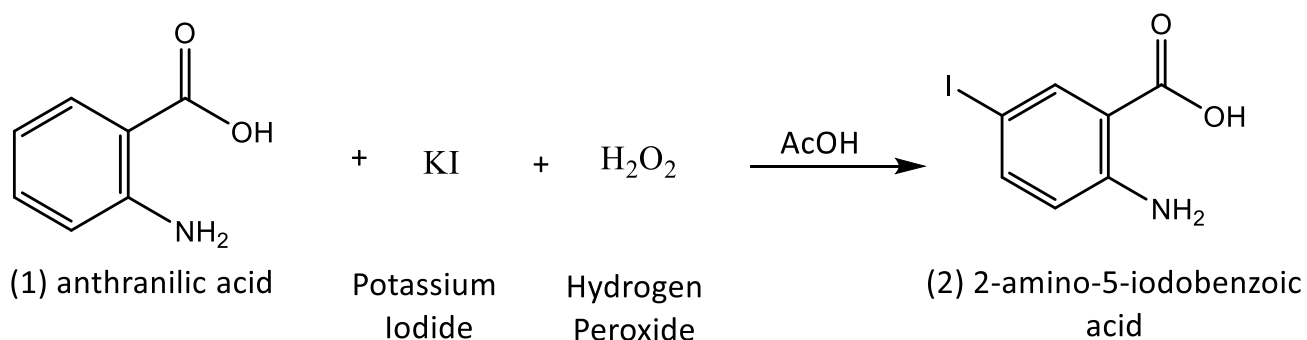


e) ethynylbenzene



### 4.3 Επιμέρους αντιδράσεις

#### Αντίδραση (i)



Αρχικά προστέθηκε ιωδιούχο κάλιο KI ( $m=6,65$  g,  $n=40,0$  mmol), σε διάλυμα 2-αμινοβενζοϊκού οξέος (**1**) ( $m=5,49$  g,  $n=40,0$  mmol) σε οξικό οξύ (AcOH,  $V=50$  mL). Έπειτα το μίγμα ψύχθηκε σε υδρόλουτρο θερμοκρασίας 5°C. Ακολούθησε προσθήκη διαλύματος υπεροξειδίου του υδρογόνου 30% κ.β. ( $V=4,5$  mL,  $n=44$ mmol) στάγδην (σε χρονικό διάστημα 5 λεπτών). Στη συνέχεια το υδρόλουτρο αποσύρθηκε και το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου ενώ η ανάδευση συνεχιζόταν. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC (1:1 hexanes-AcOEt), ενώ παρατηρήθηκε σχηματισμός στερεού προϊόντος. Όταν διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση του (**1**) (μετά από 1,5 με 2 ώρες) προστέθηκε νερό (65 mL) και το μίγμα ψύχθηκε στους 0-4 °C για μισή ώρα. Τέλος έγινε διήθηση υπό κενό στο μίγμα, το στερεό ξεπλύθηκε 4-5 φορές με κρύο νερό και αφέθηκε να ξηραθεί προστατευμένο από φως, αρχικά σε ρεύμα αέρα και μετά εντός ξηραντήρα.

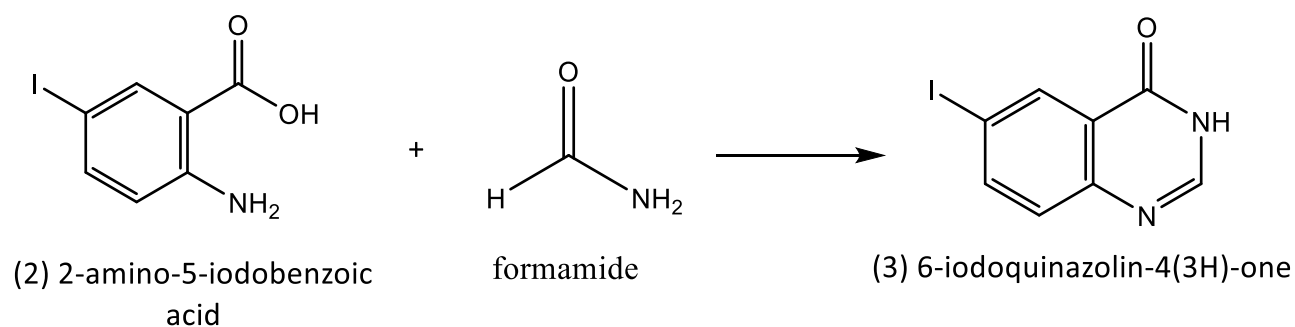
#### **Ιδιότητες Τελικού Προϊόντος:**

**Μοριακό Βάρος ( $M_r$ ): 263,03 g/mol,**

**Σημείο Τήξεως: 217-219 °C,**

**Απόδοση Αντίδρασης: 90%**

### Αντίδραση (ii):



Αρχικά μίγμα 2-αμινο-5-ιωδοβενζοϊκού οξέος (**2**) ( $m=2,63\text{g}$ ,  $n=10,0\text{mmol}$ ) και φορμαμιδίου  $\text{HCONH}_2$  ( $V=3,2\text{mL}$ ,  $n=81\text{mmol}$ ) θερμάνθηκε σε ελαιόλουτρο στους  $130\text{-}140^\circ\text{C}$ , υπό ισχυρή ανάδευση. Κατά τη θέρμανση αρχικά προέκυψε διάλυμα και στη συνέχεια παρατηρήθηκε σχηματισμός στερεού. Μετά από θέρμανση για 24 ώρες διαπιστώθηκε με TLC (1:3 hexanes-AcOEt) η πλήρης κατανάλωση του (**2**). Το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια προστέθηκε μίγμα πάγου-νερού (20mL). Μετά από ανάδευση για 15 λεπτά το μίγμα διηθήθηκε, το στερεό ξεπλύθηκε 3 φορές με κρύο νερό και αφέθηκε να ξηρανθεί προστατευμένο από φως, αρχικά σε ρεύμα αέρα και μετά εντός ξηραντήρα.

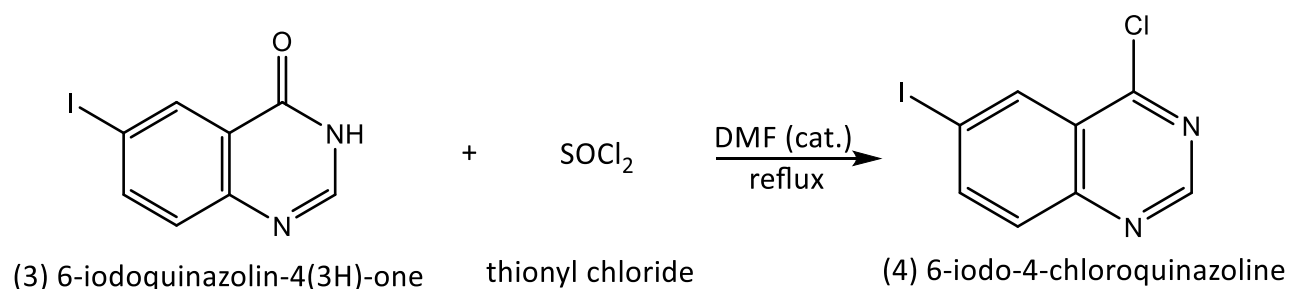
### **Ιδιότητες Τελικού Προϊόντος:**

**Μοριακό Βάρος ( $M_r$ ): 272,05 g/mol,**

**Σημείο Τήξεως: 274-276 °C,**

**Απόδοση Αντίδρασης: 89%**

### Αντίδραση (iii):



Αρχικά μίγμα 6-ιωδοκιναζολιν-4(3*H*)-όνης (**3**) ( $m=1,09\text{g}$ ,  $n=4,0\text{mmol}$ ), θειονυλοχλωριδίου  $\text{SOCl}_2$  ( $V=7,0\text{mL}$ ) και *N,N*-διμεθυλοφορμαμιδίου (DMF, 3 σταγόνες) θερμάνθηκε με reflux σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας  $95^\circ\text{C}$ . Μετά από 1 ώρα προέκυψε ένα σκούρο καφέ διάλυμα. Η πορεία της αντίδρασης ελέγχθηκε με TLC (1:4 hexanes-AcOEt) και στις 5 ώρες θέρμανσης διαπιστώθηκε η πλήρης κατανάλωση της ένωσης (**3**). Έπειτα το μίγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, στη συνέχεια απομακρύνθηκε το θειονυλοχλωρίδιο υπό κενό και το στερεό υπόλειμμα διαλύθηκε σε  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $V=50\text{mL}$ ). Το διάλυμα ξεπλύθηκε διαδοχικά με κορεσμένο υδατικό διάλυμα  $\text{NaHCO}_3$  ( $2\times 30\text{ mL}$ ) και με κορεσμένο αλατόνερο ( $1\times 30\text{ mL}$ ), ξηράνθηκε με  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το καφέ στερεό (βάρους περίπου  $1.2\text{g}$ ) καθαρίστηκε με χρωματογραφία στήλης (silica gel, έκλουση με  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) για να δώσει την (**4**) ως κιτρινωπό στερεό.

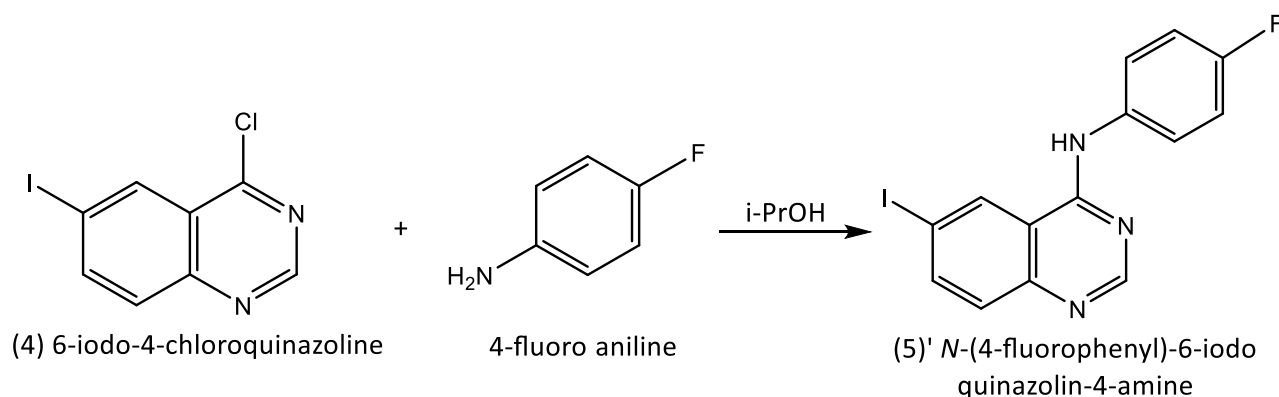
#### **Ιδιότητες Τελικού Προϊόντος:**

**Μοριακό Βάρος ( $M_r$ ): 240,49 g/mol,**

**Σημείο Τήξεως: 178-179 °C,**

**Απόδοση Αντίδρασης: 87%**

### Αντίδραση (iv):



### *Πειραματική πορεία για την (iv)*

Η 6-ιωδο-4-χλωροκιναζολίνη (**(4)**) ( $m=278\text{mg}$ ,  $n=1\text{mmol}$ ) αναμείχθηκε με ισοπροπανόλη *i*-PrOH ( $V=7,0\text{mL}$ ), προστέθηκε διάλυμα 3-φθορο-ανιλίνης ( $m=117\text{mg}$ ,  $n=1\text{mmol}$ ) σε ισοπροπανόλη ( $5,0\text{mL}$ ) και το μίγμα θερμάνθηκε με reflux σε ελαιόλουτρο θερμοκρασίας  $95^\circ\text{C}$ . Σταδιακά η (**(4)**) διαλύθηκε και σχηματίστηκε κίτρινο στερεό. Μετά από 1 ώρα διαπιστώθηκε με TLC (1:1 hexanes-AcOEt) η πλήρης κατανάλωση της (**(4)**). Το μείγμα αφέθηκε να ψυχθεί σε θερμοκρασία δωματίου, ύστερα ψύχθηκε στους  $0-4^\circ\text{C}$  για 2 ώρες και διηθήθηκε υπό κενό. Τέλος το στερεό προϊόν ξεπλύθηκε 3 φορές με ισοπροπανόλη και ξηράνθηκε προστατευμένο από φως, αρχικά σε ρεύμα αέρα και μετά εντός ξηραντήρα.

### **Ιδιότητες Τελικού Προϊόντος:**

**Μοριακό Βάρος ( $M_r$ ): 365,15 g/mol,**

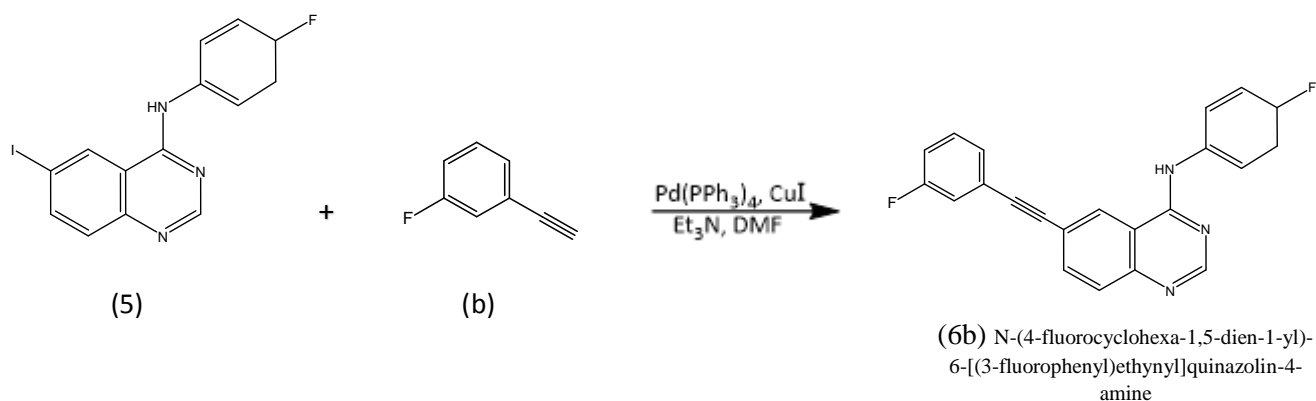
**Σημείο Τήξεως: 349-350 °C,**

**Απόδοση Αντίδρασης: 80%**





## Αντίδραση (b)



Ποσότητες αντιδραστηρίων, καταλύτη, συγκαταλύτη και διαλύτη που χρησιμοποιήθηκαν:

- (5): 0,1 mmol, 37 mg
- (b): 0,15 mmol, 29,2  $\mu\text{l}$
- Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>: 0,005 mmol, 6mg
- CuI: 0,01 mmol, 2 mg
- Et<sub>3</sub>N: 0,3 mmol, 42 $\mu\text{L}$
- DMF: 0,5 ml

Ακολουθήθηκε ακριβώς η ίδια διαδικασία με την αντίδραση (a).

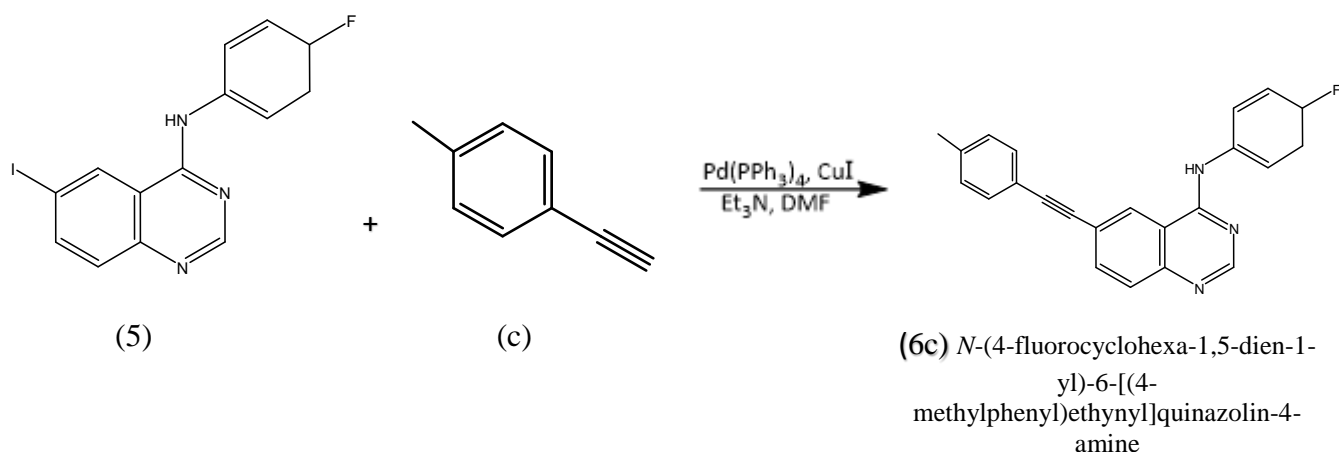
### Ιδιότητες Τελικού Προϊόντος:

**Μοριακό Βάρος (M<sub>r</sub>): 359,37 g/mol**

**Σημείο Τήξεως: 215-217 °C**

**Απόδοση: 72%**

### Αντίδραση (c)



Ποσότητες αντιδραστηρίων, καταλύτη, συγκαταλύτη και διαλύτη που χρησιμοποιήθηκαν:

- (5): 0,1 mmol, 37 mg
- (c): 0,2 mmol, 23,232 mg
- Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>: 0,01mmol, 12 mg
- CuI: 0,01 mmol, 2 mg
- Et<sub>3</sub>N: 0,3 mmol, 42μL
- DMF: 0,5 ml

Η αντίδραση έλαβε χώρα στη συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 65°C για 35 λεπτά (P=200W). Έπειτα πραγματοποιήθηκε TLC με σύστημα διαλυτών 3 εξάνιο : 1 οξικός αιθυλεστέρας, για να αξιολογηθεί η πορεία της αντίδρασης. Λόγω παρόμοιας πολικότητας των ενώσεων, χρειάστηκε το TLC να επαναληφθεί δύο φορές, για καλύτερο διαχωρισμό. Το τελικό αποτέλεσμα έδειξε ότι η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί επιτυχώς. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκχύλιση. Το μίγμα διαλύθηκε σε 10 ml διχλωρομεθανίου και εκχυλίστηκε με 10 ml νερού. Με αυτό τον τρόπο απομακρύνουμε το DMF (διαλύεται στο νερό), επειδή θα επηρεάσει την πολικότητα στη χρωματογραφία στήλης που ακολουθεί. Η εκχύλιση επαναλήφθηκε τέσσερις φορές. Η απομόνωση του προϊόντος πραγματοποιήθηκε με χρωματογραφία στήλης. Για την επιλογή του κατάλληλου συστήματος διαλυτών πραγματοποιήθηκε TLC πριν τη χρωματογραφία και τελικά το σύστημα διαλυτών που θεωρήθηκε κατάλληλο ήταν 0,05 μεθανόλη : 10 διχλωρομεθάνιο (150 ml). Το μίγμα διαλύθηκε σε

διχλωρομεθάνιο πριν την προσθήκη στη στήλη. Όταν τελείωσαν τα 150 ml του συστήματος διαλυτών, πραγματοποιήθηκε TLC στα κλάσματα που συλλέχθηκαν και δεν εμφανίστηκε κάποιο σήμα φθορισμού. Για το λόγο αυτό, η διαδικασία συνεχίστηκε με πολικότερο σύστημα διαλυτών (0,08 μεθανόλη : 10 διχλωρομεθάνιο) και τελικά στο TLC εμφανίστηκε το επιθυμητό σήμα. Τέλος, συλλέχθηκαν τα κλάσματα που περιείχαν καθαρό το προϊόν σε σφαιρική φιάλη και ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

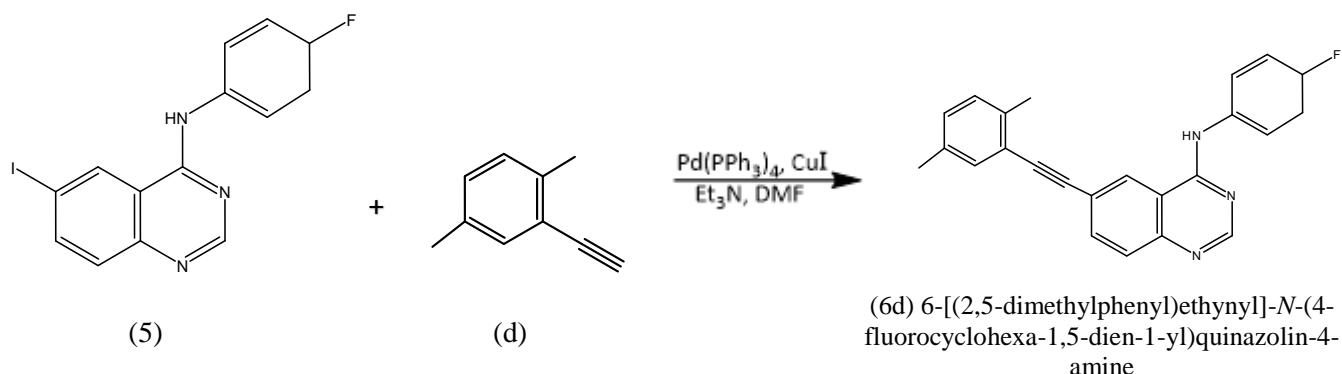
**Ιδιότητες Τελικού Προϊόντος:**

**Μοριακό Βάρος ( $M_r$ ): 355,40 g/mol**

**Σημείο Τήξεως: 216-218 °C**

**Απόδοση: 69%**

### Αντίδραση (d):



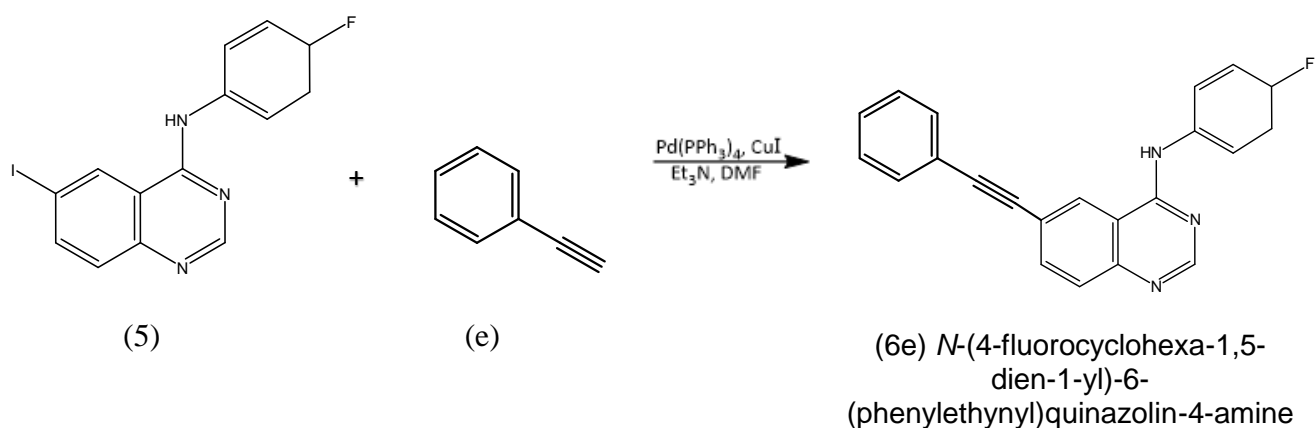
Ποσότητες αντιδραστηρίων, καταλύτη, συγκαταλύτη και διαλύτη που χρησιμοποιήθηκαν:

- (5): 0,1 mmol, 37 mg
- (d): 29  $\mu\text{l}$
- Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>: 0,01mmol, 12 mg
- CuI: 0,01 mmol, 2 mg
- Et<sub>3</sub>N: 0,3 mmol, 42 $\mu\text{L}$
- DMF: 0,5 ml

Η αντίδραση έλαβε χώρα στη συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 60 °C για 35 λεπτά (P=200W). Έπειτα πραγματοποιήθηκε TLC, με σύστημα διαλυτών 3 εξάνιο : 1 οξικός αιθυλεστέρας, για έλεγχο της πορείας της αντίδρασης. Το TLC έδειξε ότι η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί επιτυχώς. Ακολούθησε εκχύλιση, με 15-20 ml διχλωρομεθάνιο και 15 ml νερό, η οποία επαναλήφθηκε 5 φορές. Τέλος, το μίγμα που προέκυψε μετά την εκχύλιση τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη και ακολούθησε η εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα. Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης, αφού πρώτα επιλέχθηκε το κατάλληλο σύστημα διαλυτών με τη μέθοδο του TLC. Το μίγμα διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο. Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 2 οξικός αιθυλεστέρας : 8 εξάνιο, σε ποσότητα 300 ml. Όταν τελείωσαν τα 300 ml, πραγματοποιήθηκε TLC και τελικά συλλέχθηκαν τα κλάσματα τα οποία σύμφωνα με το TLC περιείχαν το προϊόν. Ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

**Ιδιότητες Τελικού Προϊόντος: Μοριακό Βάρος (M<sub>r</sub>): 369,43 g/mol, Σημείο Τήξεως: 179-181 °C, Απόδοση: 72%**

### Αντίδραση (e):



- (5): 0,1 mmol, 37 mg
- (d): 0,2 mmol, 22  $\mu\text{L}$
- Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>: 0,01mmol, 12 mg
- CuI: 0,01 mmol, 2 mg
- Et<sub>3</sub>N: 0,3 mmol, 42 $\mu\text{L}$
- DMF: 0,5 ml

Η αντίδραση έλαβε χώρα στη συσκευή μικροκυμάτων όπου θερμάνθηκε στους 60 °C για 35 λεπτά (P=200W). Έπειτα πραγματοποιήθηκε TLC, με σύστημα διαλυτών 3 εξάνιο : 1 οξικός αιθυλεστέρας, για έλεγχο της πορείας της αντίδρασης. Το TLC έδειξε ότι η αντίδραση είχε ολοκληρωθεί επιτυχώς. Ακολούθησε εκχύλιση, με 10 ml διχλωρομεθάνιο και 10 ml νερό, η οποία επαναλήφθηκε 5 φορές. Τέλος, το μίγμα που προέκυψε μετά την εκχύλιση τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη και ακολούθησε η εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

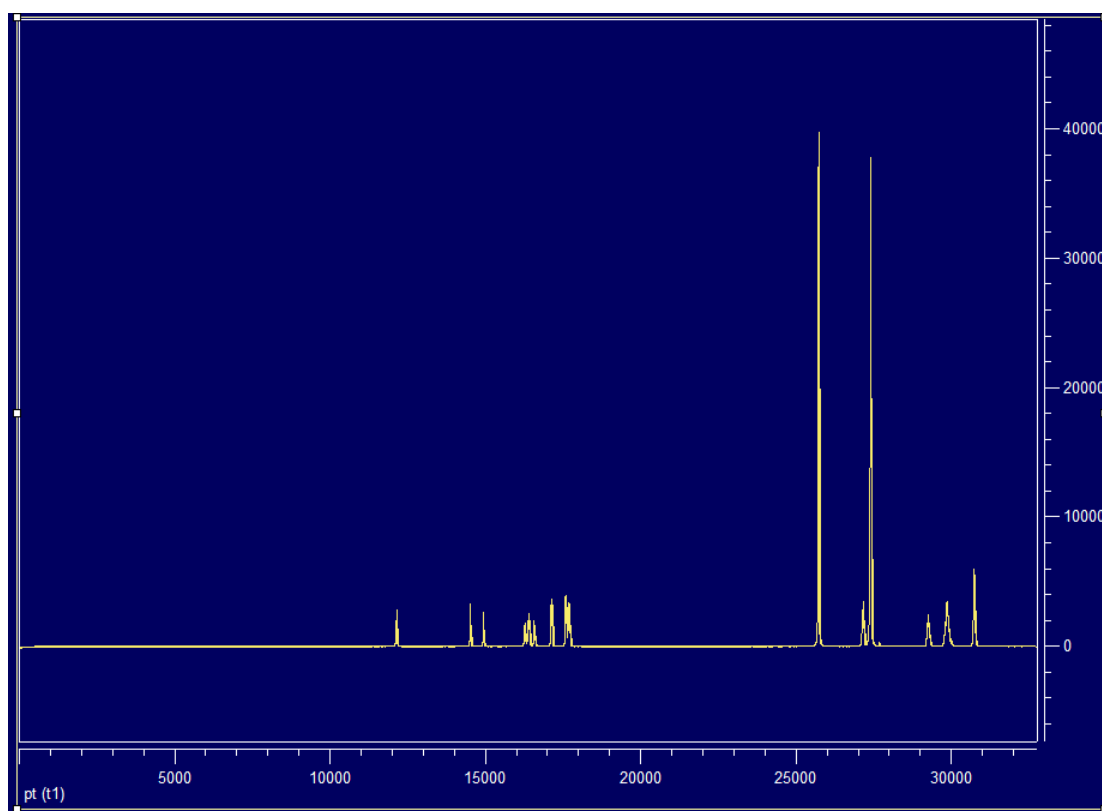
Για τον καθαρισμό του προϊόντος πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία στήλης, αφού πρώτα επιλέχθηκε το κατάλληλο σύστημα διαλυτών με τη μέθοδο του TLC. Το μίγμα διαλύθηκε σε διχλωρομεθάνιο. Το σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 170 ml εξάνιο και 30 ml οξικός αιθυλεστέρας. Όταν το σύστημα διαλυτών τελείωσε, το TLC έδειξε ότι δεν υπάρχει το επιθυμητό σήμα φθορισμού, οπότε η διαδικασία της χρωματογραφίας συνεχίστηκε με πολικότερο σύστημα διαλυτών (3 εξάνιο : 1 οξικός αιθυλεστέρας). Τελικά, πραγματοποιήθηκε ξανά TLC, το οποίο έδειξε την παρουσία προϊόντος σε συγκεκριμένα σωληνάκια. Το προϊόν συλλέχθηκε και ακολούθησε εξάτμιση του διαλύτη στον περιστροφικό εξατμιστήρα.

**Ιδιότητες Τελικού Προϊόντος: Μοριακό Βάρος (M<sub>r</sub>): 341,38 g/mol, Σημείο Τήξεως: 224-227 °C, Απόδοση: 70%**

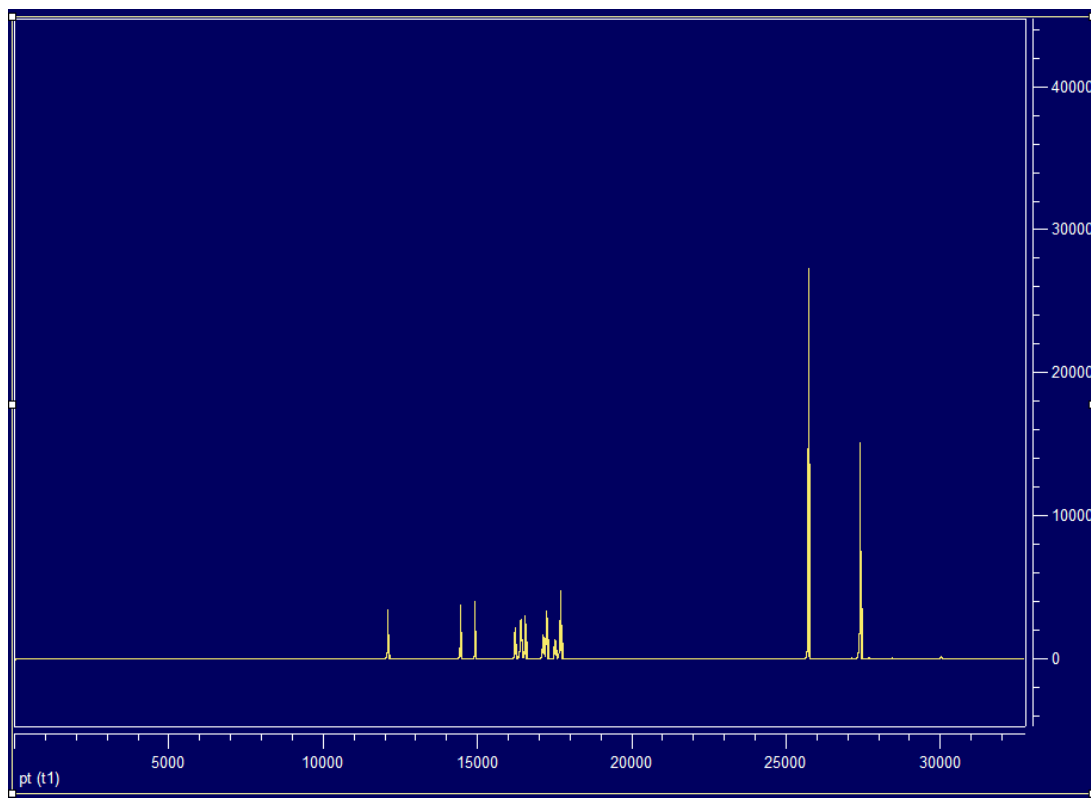
## 5. ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΕΛΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Για την ταυτοποίηση των τελικών προϊόντων του πειραματικού μέρους πραγματοποιήθηκε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) πρωτονίου και άνθρακα-13, με την οποία επιβεβαιώθηκαν η δομή και η καθαρότητα των προϊόντων και συνεπώς η επιτυχία των πειραμάτων. Παρακάτω απεικονίζονται τα φάσματα NMR των ενώσεων (**6a-e**).

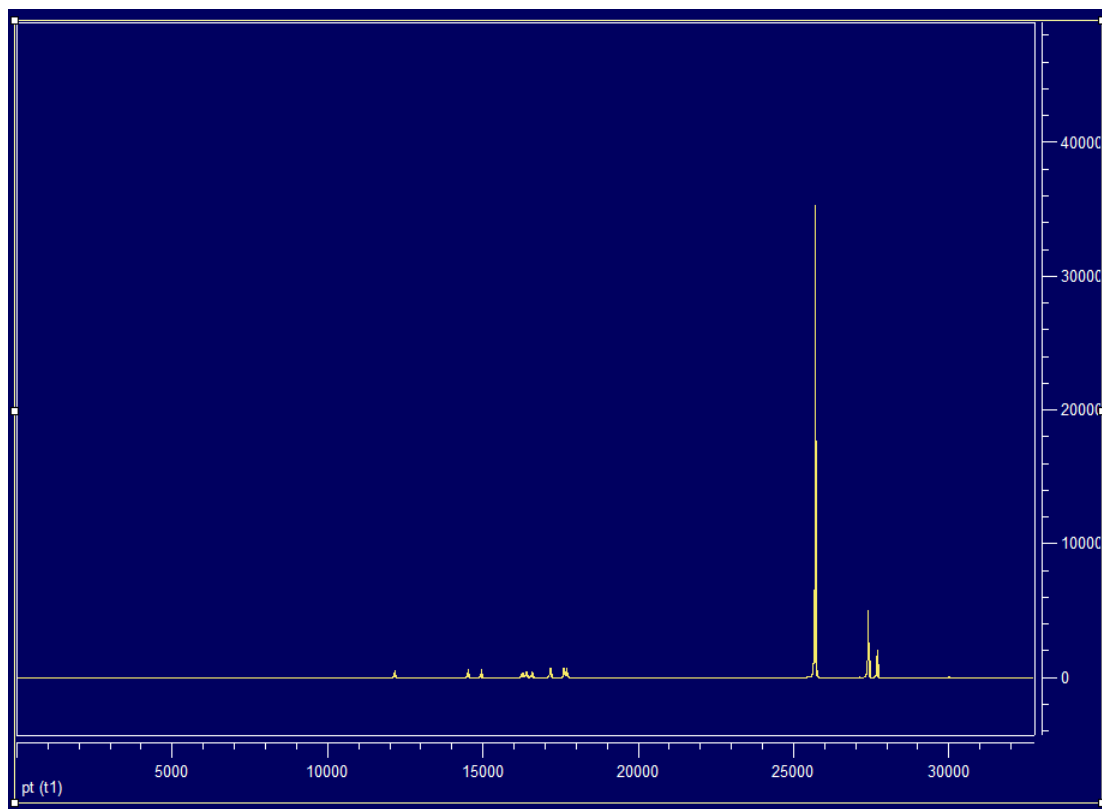
Φάσμα NMR  $^1\text{H}$  της ένωσης (**6a**)



### Φάσμα NMR $^1\text{H}$ της ένωσης (6b)

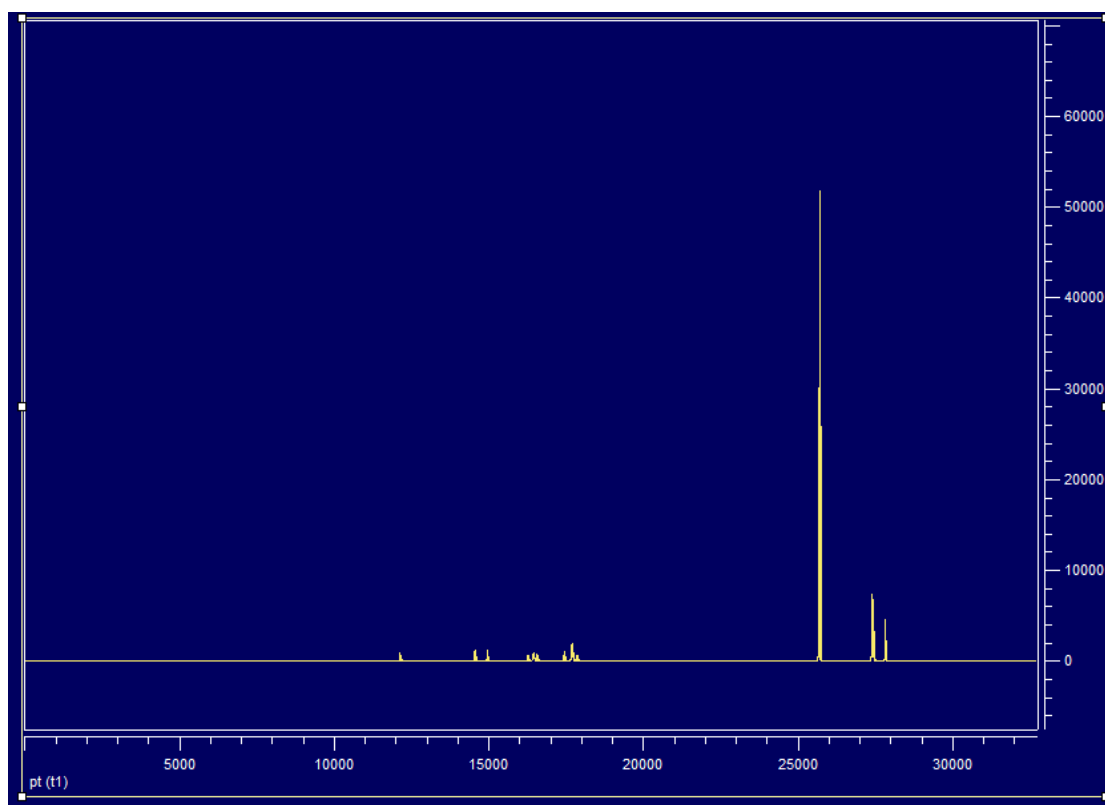


### Φάσμα NMR $^1\text{H}$ της ένωσης (6c)

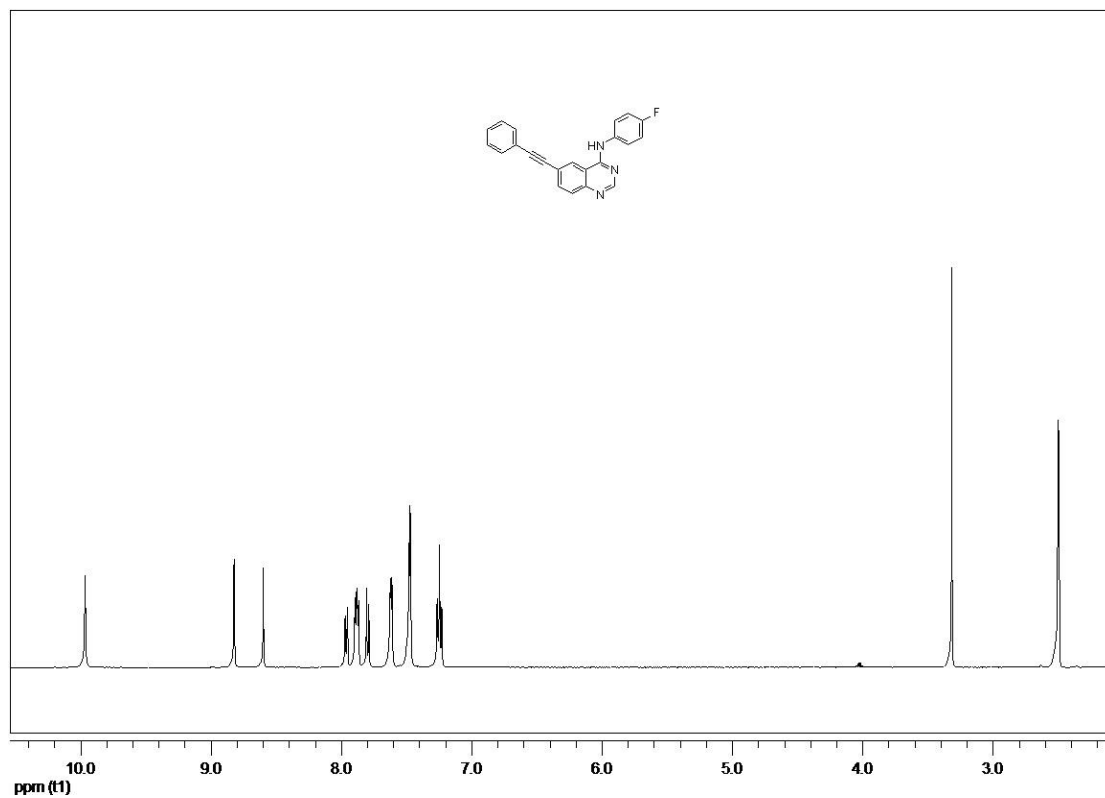




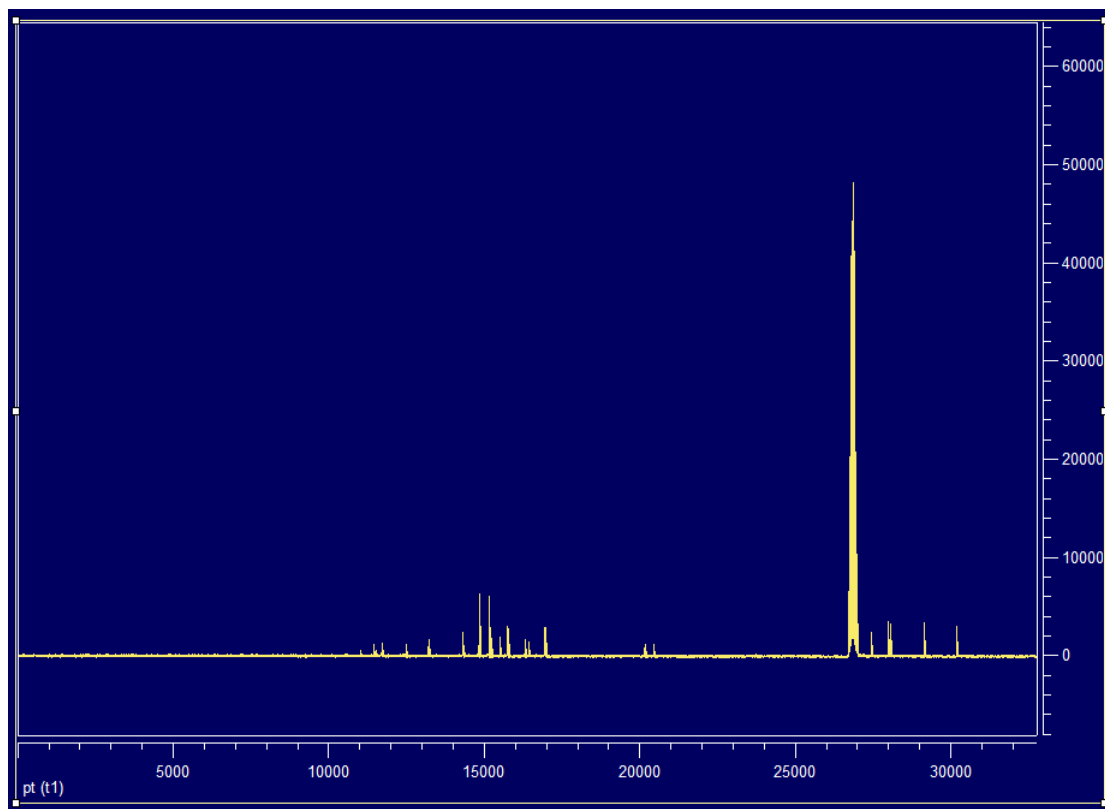
### Φάσμα NMR $^1\text{H}$ της ένωσης (6d)



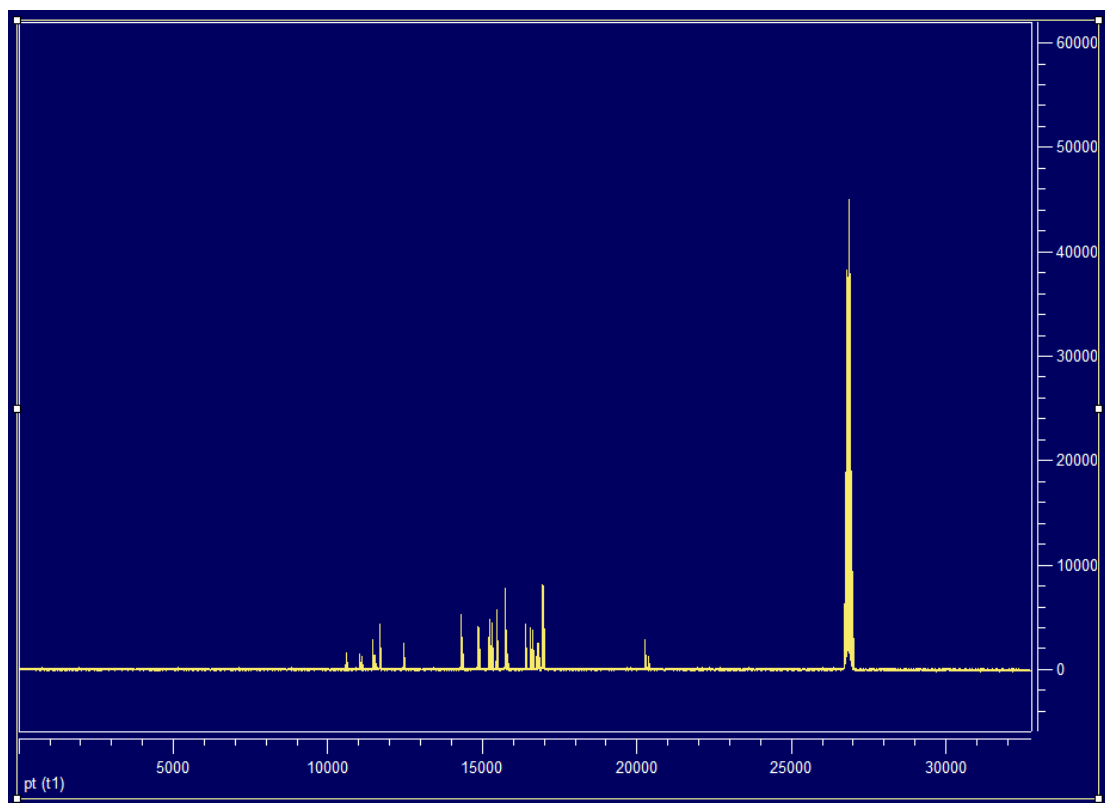
### Φάσμα NMR $^1\text{H}$ της ένωσης (6e)



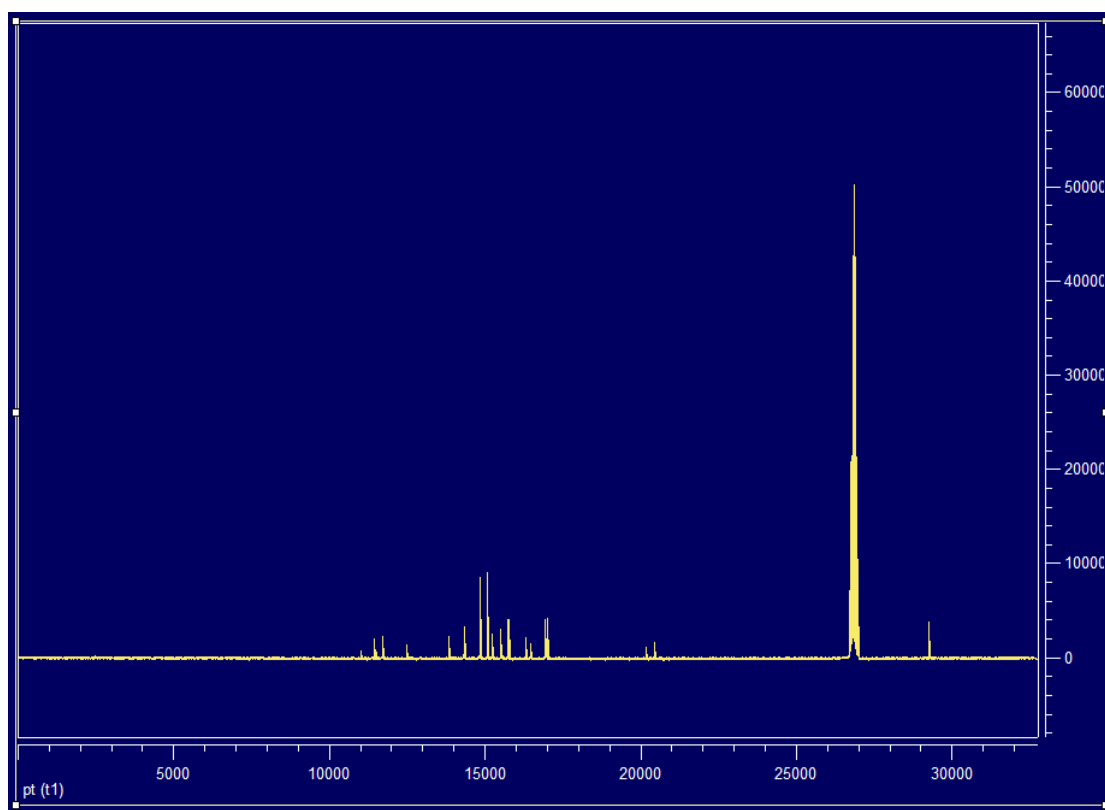
Φάσμα NMR  $^{13}\text{C}$  της ένωσης (6a)



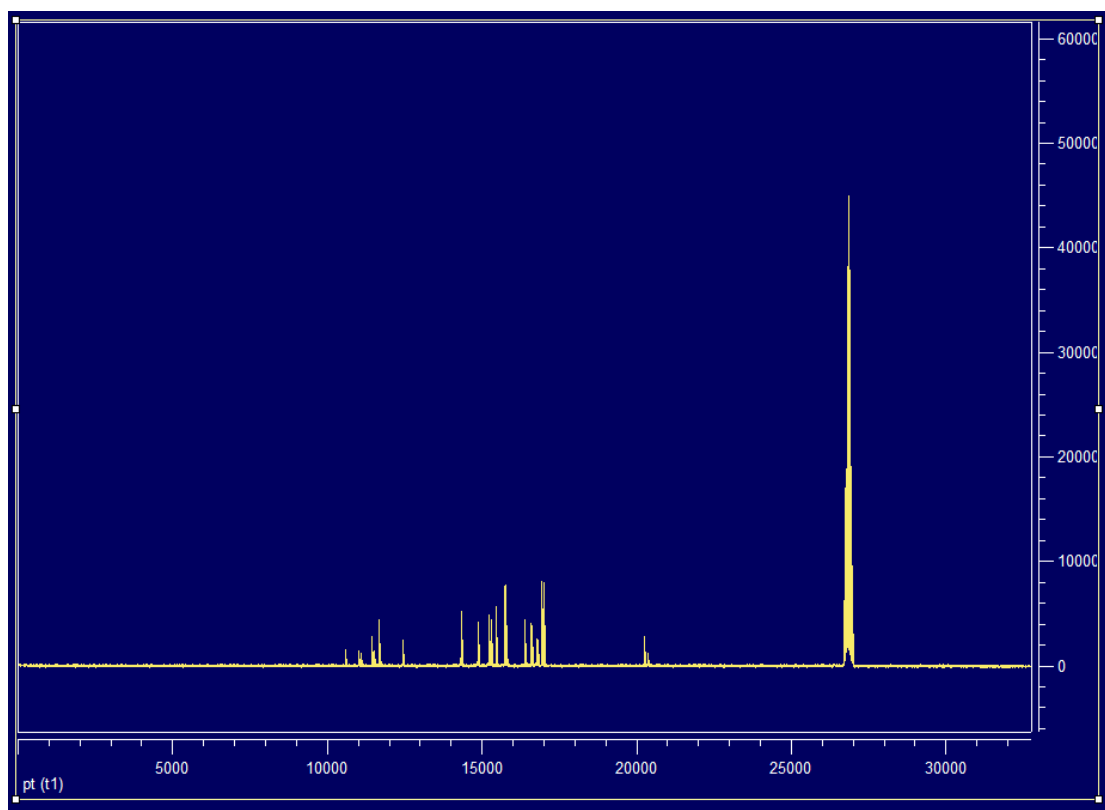
Φάσμα NMR  $^{13}\text{C}$  της ένωσης (6b)



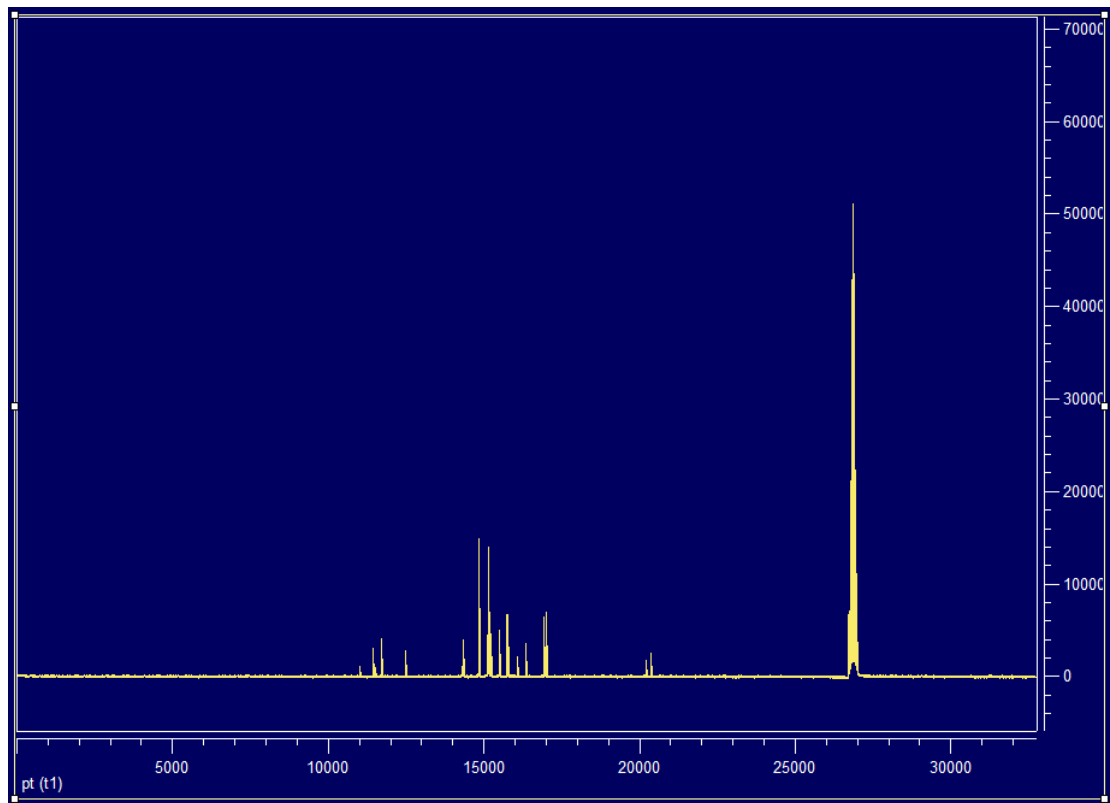
Φάσμα NMR  $^{13}\text{C}$  της ένωσης (6c)



Φάσμα NMR  $^{13}\text{C}$  της ένωσης (6d)



Φάσμα NMR  $^{13}\text{C}$  της ένωσης (6e)



## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση των πέντε νέων παραγώγων κιναζολίνης παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, ένα από τα οποία είναι και το ότι περιλαμβάνει μόλις 5 στάδια, γεγονός που την καθιστά μια πολύ σύντομη πορεία. Εξίσου σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί και το γεγονός ότι σχεδόν όλες οι αντιδράσεις απέφεραν υψηλές έως εξαιρετικά υψηλές αποδόσεις. Επιπρόσθετα, περαιτέρω καθαρισμό με χρωματογραφία στήλης χρειάστηκαν μόλις τα δύο από τα 5 στάδια της αντίδρασης (στάδια iii και v). Τέλος, η χρήση της συσκευής μικροκυμάτων στις αντιδράσεις Sonogashira, μείωσε τον χρόνο που απαιτείται για την ολοκλήρωση της αντίδρασης από 3-6 ώρες σε μόλις 30 λεπτά.

Μετά την ολοκλήρωση της πειραματικής διαδικασίας και τη σύνθεση των τελικών προϊόντων (6a-e), ακολούθησε φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για να επιβεβαιωθεί η δομή και η καθαρότητά τους. Αφού επιβεβαιώθηκε λοιπόν η επιτυχία της συνθετικής πορείας, δείγματα από όλα τα τελικά προϊόντα στάλθηκαν στο Πανεπιστήμιο της Leuven στο Βέλγιο ώστε να πραγματοποιηθεί η βιολογική τους αποτίμηση. Τα μόρια μελετήθηκαν ως προς την ανασταλτική τους δράση έναντι διαφόρων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Συγκεκριμένα, έναντι του γλοιοβλαστώματος, του παγκρεατικού αδενοκαρκινώματος, του καρκινώματος του παχέος εντέρου, του καρκινώματος των πνευμόνων, της οξείας λεμφοβλαστικής λευχαιμίας, της οξείας μυελοειδούς λευχαιμίας, της χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας και του μη-Hodgkin λεμφώματος. Η κυτταροστατική τους δράση εκτιμήθηκε μέσω της παραμέτρου IC<sub>50</sub>, η οποία αντιπροσωπεύει τη συγκέντρωση του φαρμάκου που απαιτείται για την αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης κατά 50%. Δυστυχώς, κανένα από τα μόρια που εξετάστηκαν δεν εμφάνισε αξιόλογη κυτταροτοξική δράση έναντι των καρκινικών σειρών που μελετήθηκαν. Τέλος, οι ενώσεις εξετάστηκαν και για την πιθανή αντική τους δράση σε DNA και RNA ιούς (σε κυτταρικές σειρές HEL, Hep2, VERO, Huh-7 και MDCK), όμως και πάλι τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά. Ένα ενδιαφέρον πεδίο στο οποίο θα άξιζε να μελετηθούν μελλοντικά οι ενώσεις (6a-e) είναι τα *in vitro* πειράματα ενζυμικής δραστηριότητας.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] R. S. M. Ismail, N. S. M. Ismail, S. Abuserii, and D. A. Abou El Ella, "Recent advances in 4-aminoquinazoline based scaffold derivatives targeting EGFR kinases as anticancer agents," *Futur. J. Pharm. Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 9–19, 2016.
- [2] I. Khan, A. Ibrar, W. Ahmed, and A. Saeed, "Synthetic approaches, functionalization and therapeutic potential of quinazoline and quinazolinone skeletons: The advances continue," *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015.
- [3] V. Alagarsamy, K. Chitra, G. Saravanan, V. R. Solomon, M. T. Sulthana, and B. Narendhar, "An overview of quinazolines: Pharmacological significance and recent developments," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 151, no. October 2019, pp. 628–685, 2018.
- [4] C. Yu *et al.*, "We are IntechOpen , the world ' s leading publisher of Open Access books Built by scientists , for scientists TOP 1 %," *Intech*, p. 13, 2012.
- [5] W. L. F. Armarego, *A Text Book of Quinazolines*, 1963.
- [6] M. Asif, "Chemical Characteristics, Synthetic Methods, and Biological Potential of Quinazoline and Quinazolinone Derivatives," *Int. J. Med. Chem.*, vol. 2014, pp. 1–27, 2014.
- [7] V. Alagarsamy, K. Chitra, G. Saravanan, V. R. Solomon, M. T. Sulthana, and B. Narendhar, "An overview of quinazolines: Pharmacological significance and recent developments," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 151, no. October 2019, pp. 628–685, 2018.
- [8] E. L. Abel and J. DiGiovanni, "Multistage carcinogenesis," *Curr. Cancer Res.*, 2011.
- [9] U. Trinks, E. Buchdunger, P. Furet, W. Kump, H. Mett, T. Meyer, M. Muller, U. Regenass, G. Rihs, N. Lydon, et al., Dianilinophthalimides: potent and selective, ATP-competitive inhibitors of the EGF-receptor protein tyrosine kinase, *J. Med. Chem.* 37 (1994) 1015-1027.
- [10] J. G. Paez *et al.*, "EGFR mutations in lung, cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy," *Science (80-. )*, 2004.

- [11] E. Raymond, S. Faivre, and J. P. Armand, "Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy," *Drugs*, vol. 60, no. SUPPL. 1, pp. 15–23, 2000.
- [12] R. S. Herbst, "Review of epidermal growth factor receptor biology," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2004.
- [13] I. Shchemelinin, L. Šefc, and E. Nečas, "Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases," *Folia Biol. (Praha)*, vol. 52, no. 3, pp. 81–101, 2006.
- [14] S. R. Hubbard and J. H. Till, "Protein Tyrosine Kinase Structure and Function," *Annu. Rev. Biochem.*, 2000.
- [15] Gazdar, A.F., *Epidermal growth factor receptor inhibition in lung cancer: the evolving role of individualized therapy*. *Cancer Metastasis Rev*, 2010. **29**(1): 37-48.
- [16] J. Zhang, P. L. Yang, and N. S. Gray, "Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, no. 1, pp. 28–39, 2009.
- [17] E. Mishani, G. Abourbeh, M. Eiblmaier, and C. Anderson, "Imaging of EGFR and EGFR Tyrosine Kinase Overexpression in Tumors by Nuclear Medicine Modalities," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 14, no. 28, pp. 2983–2998, 2008.
- [18] Takano, T., Ohe, Y., Sakamoto, H., Tsuta, K., Matsuno, Y., Tateishi, U., Yamamoto, S., Nokihara, H., Yamamoto, N., Sekine, I., Kunitoh, H., Shibata, T., Sakiyama, T., Yoshida, T. and Tamura, T., Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer, *J Clin Oncol*, 2005, 23, 6829-37.
- [19] Pao, W., Miller, V. A., Politi, K. A., Riely, G. J., Somwar, R., Zakowski, M. F., Kris, M. G. and Varmus, H., Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain, *PLoS Med*, 2005, 2, e73.

[20] Martin, P.; Oliver, S.; Kennedy, S. J.; Partridge, E.; Hutchison, M.; Clarke, D.; Giles, P. (2012). "Pharmacokinetics of Vandetanib: Three Phase I Studies in Healthy Subjects". *Clinical Therapeutics*. **34** (1): 221–237. doi:[10.1016/j.clinthera.2011.11.011](https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2011.11.011).

[21] Miller VA, Hirsh V, Cadranel J, Chen YM, Park K, Kim SW, et al. (May 2012). "Afatinib versus placebo for patients with advanced, metastatic non-small-cell lung cancer after failure of erlotinib, gefitinib, or both, and one or two lines of chemotherapy (LUX-Lung 1): a phase 2b/3 randomised trial". *The Lancet. Oncology*. **13** (5): 528–38.

[22] "About Us". Beta Pharma. Retrieved 31 October 2017.

[23] B. A. Teicher, "Targets in small cell lung cancer," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 87, no. 2, pp. 211–219, 2014.

[24] 2.Noronha V, Pinninti R, Patil VM, Joshi A, Prabhash K. Lung cancer in the Indian subcontinent. *South Asian J Cancer*.2016;5(3):95-103.doi:10.4103/2278-330X.187571

[25] American Cancer Society, "Lung Cancer ( Non-Small Cell ) What is non-small cell lung cancer ?," *American Cancer Society*, 2016.

[26] R. S. Herbst, D. Morgensztern, and C. Boshoff, "The biology and management of non-small cell lung cancer," *Nature*. 2018.

[27] J. G. Paez *et al.*, "EGFR mutations in lung, cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy," *Science* (80-. ), 2004.